

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Die Bedeutung von DLC1, MKL1/2 und Myoferlin für das
Proliferationsverhalten hepatozellulärer Karzinomzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Natalie Friederike Carolina Frank

aus Augsburg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Reinhart Zachoval PD Dr. med. Axel Kleespies
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	PD Dr. rer. nat. Susanne Mühlich
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	15.11.2018

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VIII
A. EINLEITUNG.....	9
A.1 DAS HEPATOZELLULÄRE KARZINOM (HCC)	9
A.2 DER TUMORSUPPRESSOR DLC1 IM HEPATOZELLULÄREN KARZINOM.....	11
A.3 DIE TRANSKRIPTIONELLEN KOAKTIVATOREN MKL1/2 (MEGAKARYOBLASTIC LEUKEMIA 1/2) IN DLC1-DEFIZIENTEN TUMORZELLEN	13
A.4 ONKOGEN-INDUZIERTER SENESZENZ IN ABHÄNGIGKEIT VON MKL1/2	16
A.5 MYOFERLIN ALS POTENTIELLES MKL1-ABHÄNGIGES ZIELGEN	17
A.6 EGF-REZEPTOR	18
A.7 ZIELSETZUNG	19
B. MATERIAL UND METHODEN.....	21
B.1 ZELLKULTUR.....	21
B.1.1 Verwendete Zelllinien	21
B.1.2 Subkultivierung und Kryokonservierung	23
B.2 RNA-INTERFERENZ MITTELS SHRNA.....	25
B.2.1 Calcium-Phosphat-Transfektion.....	26
B.2.2 Lentivirale Transduktion	28
B.3 TRANSIENTE TRANSFEKTION MIT LIPOFECTAMINE® 2000	29
B.4 WEICHAGARTEST (ANCHORAGE INDEPENDENT COLONY ASSAY).....	30
B.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	32
B.6 NACHWEIS DER β -GALACTOSIDASE-AKTIVITÄT.....	34
B.7 EXPRESSIONSANALYSEN MITTELS WESTERN BLOT.....	37
B.7.1 Zellernte für Western Blot.....	37
B.7.2 Protein-Präparation.....	39
B.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	39

B.7.4	Immobilisierung der Proteine auf einer PVDF-Membran (Wet- Blot)	41
B.7.5	Detektion mithilfe von Antikörpern	43
B.8	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	46
C.	ERGEBNISSE.....	47
C.1	CHARAKTERISIERUNG DES WACHSTUMSVERHALTENS IN ABHÄNGIGKEIT VON MKL1/2 UND DLC1.....	47
C.1.1	Autonomes Wachstumsverhalten auf Weichagar.....	47
C.1.1.1	Autonomes Wachstumsverhalten von HepG2-Zellen in Abhängigkeit von DLC1	48
C.1.1.2	Autonomes Wachstumsverhalten von HepG2- Zellen in Abhängigkeit von MKL1/2	51
C.1.2	Effekte von DLC1 und MKL1/2 auf die Zellzyklusprogression.....	52
C.1.2.1	Zellzyklusverteilung in Abhängigkeit von DLC1 in HepG2-Zellen.....	52
C.1.2.2	Zellzyklusverteilung in Abhängigkeit von MKL1/2 in HepG2-Zellen.....	53
C.1.2.3	Zellzyklusverteilung nach MKL1/2-Depletion in DLC1- defizienten HuH7-Zellen.....	55
C.2	CHARAKTERISIERUNG DES WACHSTUMSVERHALTENS IN ABHÄNGIGKEIT VON MYOFERLIN.....	57
C.2.1	Autonomes Wachstumsverhalten von HuH7-Zellen in Abhängigkeit von Myoferlin.....	57
C.2.2	Effekte der Depletion von Myoferlin auf die Zellzyklusverteilung	62
C.2.3	Seneszenzassoziierte β -Galactosidase-Aktivität	63
C.3	EXPRESSIONSANALYSEN	65
C.3.1	Abhängigkeit der Myoferlin-Expression von MKL1	65
C.3.2	Validierung der Expression von pERK im Vergleich zur Gesamt- menge an ERK nach Myoferlin-Depletion.....	66
C.3.3	Validierung der Expression des Epidermal-Growth-Faktor- Rezeptors (EGFR) im Zeitverlauf	69

C.3.3.1	Expression des EGF-Rezeptors 24 und 48 Stunden nach Myoferlin-Depletion	69
C.3.3.2	Expression des EGF-Rezeptors im Zeitraum von 4 und 7 Tagen nach Myoferlin-Depletion	70
C.3.4	Rekonstitution	72
D.	DISKUSSION.....	75
D.1	STATISTISCHE ANALYSE	75
D.2	VALIDIERUNG DES AUTONOMEN WACHSTUMSVERHALTENS AUF WEICHAGAR IN ABHÄNGIGKEIT VON DLC1 UND MKL1/2	76
D.3	ZELLZYKLUSVERHALTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DLC1 UND MKL1/2	78
D.4	VALIDIERUNG VON MYOFERLIN ALS MKL1-ABHÄNGIGES ZIELGEN.....	81
D.5	WACHSTUMSVERHALTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON MYOFERLIN	81
D.5.1	Myoferlin-Depletion bewirkt signifikant verminderte Koloniebildung auf Weichagar	82
D.5.2	Effekte der Myoferlin-Depletion auf das Zellzyklusverhalten.....	84
D.5.3	Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase-Aktivität nach Myoferlin-Depletion	85
D.6	ERK-AKTIVIERUNG NACH MYOFERLIN-DEPLETION.....	86
D.7	VERSTÄRKTE EXPRESSION DES EGF-REZEPTORS NACH MYOFERLIN-DEPLETION.....	87
D.8	REKONSTITUTION.....	91
D.9	ÜBERSICHT AUSWIRKUNG DER MYOFERLIN-DEPLETION AUF HUH7-ZELLEN UND AUSBLICK	93
E.	ZUSAMMENFASSUNG.....	95
F.	ANHANG	96
	LITERATURVERZEICHNIS.....	101
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	114
	DANKSAGUNG.....	118

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	119
------------------------------------------	------------

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.	Schematische Darstellung des Modells der MKL1-abhängigen Tumorigenese nach DLC1-Verlust (aus Mühlich et al. 2012).	15
Abbildung 2.	Koloniebildung DLC1-depletierter HepG2-Zellen auf Weichagar im Vergleich zu HepG2-Kontrollzellen (20.000 ausgesäte Zellen).	50
Abbildung 3.	Koloniebildung DLC1-depletierter HepG2-Zellen auf Weichagar im Vergleich zu HepG2-Kontrollzellen (40.000 ausgesäte Zellen).	50
Abbildung 4.	Koloniebildung in HepG2-Zellen in Abhängigkeit von MKL1/2 auf Weichagar.	51
Abbildung 5.	Prozentualer Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus bei HepG2-Zellen in Abhängigkeit von DLC1.	53
Abbildung 6.	Prozentualer Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus bei HepG2-Zellen in Abhängigkeit von MKL1/2.	54
Abbildung 7.	Prozentualer Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus nach Depletion von MKL1/2 in HuH7-Zellen.	56
Abbildung 8.	Koloniebildung Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen auf Weichagar im Vergleich zu HuH7-Kontrollzelllinien.	58
Abbildung 9.	Übersicht Koloniebildung Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen auf Weichagar im Vergleich zu Kontrollzelllinien.	59
Abbildung 10.	Verminderte Koloniebildung Myoferlin-depletierter Zellen auf Weichagar (20.000 ausgesäte Zellen).	61
Abbildung 11.	Verminderte Koloniebildung Myoferlin-depletierter Zellen auf Weichagar (40.000 ausgesäte Zellen).	61
Abbildung 12.	Nachweis der Knockdown-Effizienz von Myoferlin der in Abbildung 10 und Abbildung 11 aufgeführten Zelllinien.	62
Abbildung 13.	Myoferlin-Expression der für Zellzyklusanalysen (vgl. Tabelle 16) verwendeten Zelllinien.	63
Abbildung 14.	Effizienz der Myoferlin-Depletion der für Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase-Aktivität eingesetzten Zellen	64
Abbildung 15.	Überexpression von MKL1 führt zu verstärkter Myoferlin-Expression in HuH7-Zellen.	66
Abbildung 16.	pERK- und ERKtotal-Expression in Myoferlin-depletierten HuH7-Zellen 7 Tage nach lentiviraler Transduktion.	68

Abbildung 17. Nachweis der Depletion von Myoferlin bei den in Abbildung 16 aufgeführten Proben.	68
Abbildung 18. Expression des EGF-Rezeptors 24 und 48 Stunden nach Myoferlin-Depletion.	70
Abbildung 19. Nachweis der Depletion von Myoferlin bei den in Abbildung 18 aufgeführten Proben.	70
Abbildung 20. Expression EGF-Rezeptors 4 Tage nach lentiviraler Transduktion.	71
Abbildung 21. Expression EGF-Rezeptor und pEGFR 7 Tage nach lentiviraler Transduktion. (Knockdown-Effizienz vgl. Abbildung 17, S. 68)	71
Abbildung 22. Rekonstitutionsexperiment 24 h nach lentiviraler Transduktion, Nachweis der MKL1 und Myoferlin-Expression sowie der Expression des EGF-Rezeptors.	73
Abbildung 23. Rekonstitution 48 h nach lentiviraler Transduktion, Nachweis der MKL1- und Myoferlin-Expression sowie der Expression von EGFRtotal, ERKtotal und phospho-ERK.	74
Abbildung 24. QQ-Plot HepG2-Zellen für Zellzyklusanalysen (Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, vgl. Abschnitt C.1.2.1)	96
Abbildung 25. QQ-Plot HepG2-DLC1-KD-Zellen für Zellzyklusanalysen (Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, vgl. Abschnitt C.1.2.1)	96
Abbildung 26. QQ-Plot HepG2-Zellen für Zellzyklusanalysen (Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, vgl. Abschnitt C.1.2.2)	97
Abbildung 27. QQ-Plot HepG2-MKL1/2-KD-Zellen für Zellzyklusanalysen (Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, vgl. Abschnitt C.1.2.2)	97
Abbildung 28. QQ-Plot HuH7-Zellen für Zellzyklusanalysen (Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, vgl. Abschnitt C.1.2.3)	98
Abbildung 29. QQ-Plot HuH7-MKL1/2-KD-Zellen für Zellzyklusanalysen (vgl. Abschnitt C.1.2.3)	98
Abbildung 30. QQ-Plot HuH7-Zellen nach Leervektor-Transduktion für Weichagaranalysen bei 20.000 ausgesäten Zellen (vgl. Abschnitt C.2.1, Abbildung 10)	99
Abbildung 31. QQ-Plot Myoferlin-depletierte HuH7-Zellen nach Leervektor-Transduktion für Weichagaranalysen bei 20.000 ausgesäten Zellen (vgl. Abschnitt C.2.1, Abbildung 10)	99
Abbildung 32. QQ-Plot HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion für Weichagaranalysen bei 40.000 ausgesäten Zellen (vgl. Abschnitt C.2.1, Abbildung 11)	100

Abbildung 33. QQ-Plot Myoferlin-depletierte HuH7-Zellen für Weichagaranalysen bei 40.000 ausgesäten Zellen (vgl. Abschnitt C.2.1, Abbildung 11)	100
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.	In der vorliegenden Arbeit verwendete Zelllinien.....	22
Tabelle 2.	Eingesetzte Lösungen zur Subkultivierung der Zelllinien.	25
Tabelle 3.	Zur Calcium-Phosphat-Transfektion eingesetzte Plasmide/ shRNA.	27
Tabelle 4.	Zur Transfektion mit Lipofectamine ® 2000 eingesetzte Plasmide.....	29
Tabelle 5.	Zusammensetzung des Trenngels. (Mengenangaben für 2 Gele)	41
Tabelle 6.	Zusammensetzung des Sammelgels. (Mengenangabe für 2 Gele).....	41
Tabelle 7.	Verwendete Primärantikörper.....	45
Tabelle 8.	Verwendete Sekundärantikörper.	45
Tabelle 9.	Koloniebildung in HepG2-Kontrollzellen im Vergleich zu HepG2-DLC1-Knockdown-Zellen.....	49
Tabelle 10.	Koloniebildung in HepG2-Kontrollzellen im Vergleich zu HepG2-Zellen mit MKL1/2-Knockdown.....	51
Tabelle 11.	Prozentualer Anteil an Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bei HepG2-Zellen in Abhängigkeit von DLC1.	53
Tabelle 12.	Prozentualer Anteil an Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bei HepG2-Zellen in Abhängigkeit von MKL1/2	54
Tabelle 13.	Prozentualer Anteil an Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bei HuH7-Zellen in Abhängigkeit von MKL1/2.....	55
Tabelle 14.	Koloniebildung auf Weichagar Myoferlin-depletierter Zellen im Vergleich zu HuH7-Kontrollzellen und HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion (20.000 ausgesäte Zellen).....	59
Tabelle 15.	Koloniebildung Myoferlin-depletierte Zellen auf Weichagar im Vergleich zu HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion.	60
Tabelle 16.	Prozentuale Verteilung auf die Zellzyklusphasen bei HuH7-Zellen in Abhängigkeit von Myoferlin.	63
Tabelle 17.	β-Galactosidase-Aktivität Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen.....	64
Tabelle 18.	Quantifizierung pERK-Expression Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen im Vergleich zu Kontrollzelllinien 7 Tage nach lentiviraler Transduktion mittels Image J.....	68

A. EINLEITUNG

A.1 DAS HEPATOZELLULÄRE KARZINOM (HCC)

Das hepatozelluläre Karzinom (HCC, Leberzellkarzinom) ist weltweit die fünfthäufigste Tumorerkrankung (Leitlinienprogramm, 2013). Die Hochinzidenzzone für das hepatozelluläre Karzinom liegt in tropischen Ländern (Südostasien, Afrika (Südsahara), China) mit 30-120 Erkrankungsfällen pro 100.000 Personen (Riede *et al.*, 2004). In den westlichen Industrienationen tritt das hepatozelluläre Karzinom weniger gehäuft auf, diese Länder werden als Niedriginzidenzzone bezeichnet (Riede *et al.*, 2004). Jedoch ist auch in diesen Ländern die Inzidenz steigend mit fünf Erkrankungsfällen pro 100.000 Einwohner jährlich (Herold, 2012). Männer erkranken insgesamt häufiger als Frauen am hepatozellulären Karzinom (Herold, 2012). Die Erkrankung tritt in Niedriginzidenzzonen eher bei Personen ab 50 Jahren auf, in den Hochinzidenzzonen eher bei jüngeren Patienten (Riede *et al.*, 2004).

Das hepatozelluläre Karzinom entwickelt sich zumeist auf dem Boden einer Leberzirrhose, je nach Autor werden 60-90 % der HCC-Fälle auf eine Leberzirrhose zurückgeführt (Herold, 2012; Kellner, 2013; Riede *et al.*, 2004). Als wichtige ätiopathologische Faktoren sind zudem Infektionen mit Viren zu nennen (Herold, 2012; Kellner, 2013; Riede *et al.*, 2004). Demnach ist die geographisch unterschiedliche Inzidenz des hepatozellulären Karzinoms auf die Prävalenz des Hepatitis B-Virus zurückzuführen (Riede *et al.*, 2004). Auch eine Hepatitis-C-Virus-Infektion kann der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms zugrunde liegen (Llovet *et al.*, 2004; Riede *et al.*, 2004). Ebenfalls die Krankheitsentstehung begünstigende Faktoren sind Alkoholabusus, Hämochromatose und Aflatoxin (Riede *et al.*, 2004). Die in Deutschland bedeutsamsten Risikofaktoren, die der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms zugrunde liegen, sind die chronische Infektion mit dem Hepatitis-C-Virus sowie der Konsum von Alkohol (Leitlinienprogramm, 2013). Die gestiegene Inzidenz der nicht-alkoholischen Fettlebererkrankung in westlichen Industrienationen als Folgeerkrankung von Diabetes und Übergewicht ist ein weiterer Risikofaktor, welcher die zunehmende Anzahl an Neuerkrankungen des hepatozellulären Karzinoms bedingt (Leitlinienprogramm, 2013; Starley *et al.*, 2010).

Als dem hepatozellulären Karzinom vorausgehende Veränderungen werden die präkanzeröse Leberdysplasie und dysplastische Knoten, die vor allem bei Leberzirrhose zu finden sind, angesehen (Riede *et al.*, 2004). Das hepatozelluläre Karzinom imponiert makroskopisch mit einer gelblich-weißen Schnittfläche (Kellner, 2013), und kann in vier Subtypen unterteilt werden: infiltrativer Typ, expansiver Typ, gemischt expansiv-infiltrativer Typ, diffuser Typ (Riede *et al.*, 2004). Auch histologisch können verschiedene Wachstumsmuster unterschieden werden und eine Einteilung in verschiedene Malignitätsgrade zwischen G1 (hoch differenziert) und G4 (undifferenziert) vorgenommen werden (Riede *et al.*, 2004). Zur Stadieneinteilung wird das sog. BCLC-System (*Barcelona Clinic Liver Cancer Staging-System*) herangezogen (Leitlinienprogramm, 2013; Llovet *et al.*, 2008). Dieses System vereinigt das Tumorstadium, die Leberfunktion und den Effekt verschiedener Therapien auf die Prognose (Leitlinienprogramm, 2013).

Das hepatozelluläre Karzinom zeichnet sich durch langsames Wachstum aus (Kellner, 2013). Intrahepatische Metastasen sind, abhängig von der Größe des Primärtumors, häufig anzutreffen (Bader *et al.*, 2010). So finden sich bei hepatozellulären Karzinomen, die eine Größe von über 5 cm aufweisen, zu 90 % intrahepatische Metastasen (Bader *et al.*, 2010). Die extrahepatische lymphogene Metastasierung ist erst spät im Krankheitsverlauf zu beobachten, die hämatogene Metastasierung in Lunge, Knochen oder Nebennieren tritt nur vereinzelt auf (Bader *et al.*, 2010). Allerdings infiltriert das hepatozelluläre Karzinom oft das venöse System, dies kann zu einer Pfortaderthrombose führen (Riede *et al.*, 2004).

Die Symptome sind oft unspezifisch (Riede *et al.*, 2004) und äußern sich als Druckschmerz im Oberbauch, Gewichtsverlust und subfebrile Temperaturen (Herold, 2012; Holstege *et al.*, 2013). Oft erst spät im Krankheitsverlauf tritt ein Ikterus auf, paraneoplastische Syndrome sind möglich (Herold, 2012; Holstege *et al.*, 2013).

Nur in wenigen Fällen besteht die Möglichkeit einer kurativen Behandlung (Holstege *et al.*, 2013). Als kurative Maßnahmen kommen die Leberteileresektion oder Lebertransplantation in Frage, des Weiteren ist eine Radiofrequenzablation möglich (Holstege *et al.*, 2013; Waghray *et al.*, 2015). In fortgeschrittenen Stadien und als palliative Therapie wird der Multikinaseinhibitor Sorafenib eingesetzt (Leitlinienprogramm, 2013; Waghray *et al.*, 2015). Die Prognose ist meist sehr schlecht, die Überlebensrate nach

einem Zeitraum von 5 Jahren ist kleiner als 5 % (Bubendorf *et al.*, 2011; Holstege *et al.*, 2013). Auch nach erfolgreicher Resektion oder Ablation beträgt das Risiko eines Rezidivs 70 % (Leitlinienprogramm, 2013).

Aufgrund der begrenzten therapeutischen Möglichkeiten ist es von hoher klinischer Relevanz, die molekularen Mechanismen der Karzinogenese aufzudecken und damit molekulare Angriffspunkte einer gezielten pharmakologischen Therapie zu identifizieren. Molekulare Therapien wurden in Studien getestet, jedoch konnte bislang mit noch keiner Substanz eine Verlängerung des Gesamtüberlebens erzielt werden (Leitlinienprogramm, 2013). Einzig Sorafenib als Inhibitor von Kinasen (Inhibitor der Serin-Theronin-Kinasen Raf-1 und B-Raf sowie der Rezeptortyrosinkinasen des VEGF-Rezeptors und PDGF-Rezeptors- β) steht als systemische Therapie zur Verfügung und wird bei verschiedenen Indikationen eingesetzt (Leitlinienprogramm, 2013; Tejeda-Maldonado *et al.*, 2015). Unter Sorafenib-Therapie zeigte sich jedoch keine Verbesserung der Lebensqualität oder Verlängerung bis zur Symptomprogression (Leitlinienprogramm, 2013).

Es ist daher von großer Bedeutung, neue molekulare Zielstrukturen für erfolgversprechende Therapiestrategien zu identifizieren. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein wichtiger Signalweg der Tumorentstehung, bedingt durch den Verlust des Tumorsuppressors DLC1 in hepatozellulären Karzinomen, näher untersucht.

A.2 DER TUMORSUPPRESSOR DLC1 IM HEPATOZELLULÄREN KARZINOM

1998 konnten Yuan *et al.* ein Gen, welches in hepatozellulären Karzinomen häufig deletiert ist, als potentiellen Tumorsuppressor identifizieren (Yuan *et al.*, 1998). Dieses Gen wurde als DLC1, *Deleted in liver cancer 1* bezeichnet (Yuan *et al.*, 1998). DLC1 ist auf Chromosom 8p21.3-22 lokalisiert (Yuan *et al.*, 1998). Auf diesem chromosomalen Abschnitt tritt häufig ein Verlust der Heterozygotie auf, dies ist außer bei hepatozellulären Karzinomen etwa beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom, Colorektalen Karzinom und Prostata-Karzinom beschrieben (Visakorpi *et al.*, 1995; Yuan *et al.*, 1998). DLC1 ist nach Yuan *et al.* bei 50 % der primären hepatozellulären Karzinome deletiert, Wong *et al.* beschreiben einen Verlust der Heterozygotie in 44-50 % der untersuchten Fälle (Wong *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 1998). Die heterozygote Deletion von

DLC1 konnte in hepatozellulären Karzinomen häufiger beobachtet werden als etwa die Deletion des Tumorsuppressors p53 (Xue *et al.*, 2008). Auch bei anderen Tumorerkrankungen wie Lungenkrebs, Kolonkarzinom oder Brustkrebs treten DLC1-Deletionen fast so häufig auf wie p53-Deletionen (Xue *et al.*, 2008).

2003 wurden nähere Erkenntnisse zur Funktion des humanen DLC1-Gens erzielt. Wong *et al.* konnten zeigen, dass DLC1 als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) für RhoA und Cdc42 wirkt (Wong *et al.*, 2003). RhoA und Cdc42 gehören zur Rho-Familie von kleinen GTPasen (Lancaster *et al.*, 1994). GTPasen wirken als molekulare Schalter (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Dies geschieht dadurch, dass GTPasen zwischen einem GTP-gebundenen, aktiven Zustand und einem GDP-gebundenen inaktiven Zustand alternieren können (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Die intrinsische GTPase-Aktivität von GTPasen wie RhoA wird durch GTPasen-aktivierende Proteine (GAP) angeregt. Somit werden GTPasen durch GTPase-aktivierende Proteine von der aktiven Form in die inaktive, GDP-gebundene Form umgewandelt (Lancaster *et al.*, 1994).

GTPasen sind an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. So regulieren GTPasen der Rho-Familie eine Vielzahl von Signaltransduktionswegen (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Des Weiteren sind Rho-GTPasen beispielsweise auch an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts sowie an der Zellzyklusprogression beteiligt (Etienne-Manneville & Hall, 2002; Hall, 1998).

Xue *et al.* zeigten 2008, dass bei verminderter Expression des Rho-GTPase-aktivierenden Proteins DLC1 der Gehalt an GTP-gebundenen RhoA erhöht ist (Xue *et al.*, 2008).

Im Mausmodell konnte bereits ein Zusammenhang zwischen der Expression des Tumorsuppressors DLC1 in hepatozellulären Karzinomzellen und der Tumorigenität hergestellt werden. Nach Zhou *et al.* (2008) konnte durch das Wiedereinbringen von DLC1 in hepatozelluläre Karzinomzelllinien Hinweise auf eine Beteiligung von DLC1 an der Metastasierung festgestellt werden. Die Überexpression von DLC1 in HCC-Zelllinien ging mit einer verminderten RhoA-Aktivierung einher (Zhou *et al.*, 2008). Die Aktivierung der GTPase RhoA scheint sowohl nötig als auch ausreichend zu sein, um die Entstehung von hepatozellulären Karzinomen *in vivo* zu fördern (Grise *et al.*, 2009).

Auch in anderen Tumorentitäten scheint DLC1 eine wichtige Rolle zu spielen. Durch Daten von Yuan *et al.* am Mausmodell ergeben sich Hinweise, dass durch Rekonstitution von DLC1 die Tumorigenität im Mammakarzinom-Modell vermindert wird (Yuan *et al.*, 2003). Auch beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom gibt es Anhaltspunkte, dass in Tumorzelllinien nach Transfer von DLC1 die Zellproliferation vermindert ist (Yuan *et al.*, 2004).

Im Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten des hepatozellulären Karzinoms ist es daher von Bedeutung, die Mechanismen der DLC1-abhängigen Tumorigenese näher zu analysieren. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden Aspekte der DLC1-abhängigen Tumorigenese in hepatozellulären Tumorzelllinien näher untersucht. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten die transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2 als an der DLC1-abhängigen Tumorprogression im hepatozellulären Karzinom beteiligte Proteine identifiziert werden (Mühlich *et al.*, 2012).

A.3 DIE TRANSKRIPTIONELLEN KOAKTIVATOREN MKL1/2 (MEGAKARYOBLASTIC LEUKEMIA 1/2) IN DLC1-DEFIZIENTEN TUMORZELLEN

Durch Befunde der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich konnte 2012 gezeigt werden, dass die transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2 (*Megakaryoblastic leukemia 1/2*) in DLC1-defizienten hepatozellulären Tumorzellen als Mediatoren der tumorigenen Transformation fungieren (Mühlich *et al.*, 2012).

MKL1 wurde 2001 erstmals als ein Gen beschrieben, dass bei der akuten megakaryoblastischen Leukämie durch Translokation Teil eines Fusionsgens wird (Ma *et al.*, 2001; Mercher *et al.*, 2001). Das humane MKL2-Gen wurde 2003 identifiziert (Selvaraj & Prywes, 2003).

Sowohl MKL1 als auch MKL2 gehören zu einer Familie von transkriptionellen Koaktivatoren, die an den Transkriptionsfaktor SRF (*Serum Response Factor*) binden und dadurch die Transkription *Serum Response Element* (SRE)-abhängiger Zielgene aktivieren (Cen *et al.*, 2003; Selvaraj & Prywes, 2003). SRE ist ein regulatorisches Element, an das der Transkriptionsfaktor SRF bindet (Treisman, 1992).

MKL1 und 2 werden als redundant in ihrer Wirkung angesehen (Cen *et al.*, 2003) und werden in einer Vielzahl embryonaler und adulter Gewebe exprimiert (Pipes *et al.*, 2006; Selvaraj & Prywes, 2003).

2003 zeigten erste Hinweise, in welcher Weise MKL1 reguliert wird. So wirkt MKL1 durch die Regulation über den Rho-Aktin-Signalweg als transkriptioneller Koaktivator von SRF (Miralles *et al.*, 2003). MKL1 assoziiert mit unpolymerisiertem Aktin (Miralles *et al.*, 2003). Die Rho-induzierte Aktinpolymerisation bewirkt, dass MKL1 vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert (Miralles *et al.*, 2003). Nukleäres MKL1 ist die Voraussetzung für die Aktivierung von SRF und die Induktion von SRF-abhängigen Zielgenen (Miralles *et al.*, 2003). Der nukleäre Export von MKL1 erfolgt über die Phosphorylierung von MKL1 und die dadurch verstärkte Bindung an Aktin (Mühlich *et al.*, 2008). Die Phosphorylierung wird über den ERK1/2-Signalweg reguliert (Mühlich *et al.*, 2008). Jüngste Befunde zeigen, dass neben der zytoplasmatischen auch eine nukleäre Aktinpolymerisation für die SRF-Aktivierung verantwortlich ist (Baarlink *et al.*, 2013).

Der Transkriptionsfaktor SRF ist an zahlreichen zellulären Prozessen wie Zellwachstum, Zellmigration und Organisation des Zytoskeletts beteiligt (Pipes *et al.*, 2006). Durch den Transkriptionsfaktor SRF werden sog. „*Immediate Early-Genes*“ (IEG) induziert, MKL1/2 sind dabei über den RhoA-Signalweg und Bindung an SRF an der Expression von „*Immediate Early-Genes*“ beteiligt (Cen *et al.*, 2004; Selvaraj & Prywes, 2004). „*Immediate Early-Genes*“ werden sehr schnell als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli exprimiert und sind beispielsweise für die Progression von der G0-Phase des Zellzyklus zur G1-Phase von Bedeutung (Thomson *et al.*, 1999). Durch Serum-Zugabe kommt es zur Induktion der „*Immediate Early-Genes*“ (Schratt *et al.*, 2001). Während der Progression des Zellzyklus spielt die Induktion von *Immediate Early-Genes* durch SRF eine wichtige Rolle (Schratt *et al.*, 2001).

Daten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich stellen einen Zusammenhang zwischen der RhoA-abhängigen Induktion von Zielgenen via SRF bzw. MKL1/2 und dem Tumorsuppressor DLC1 her (Mühlich *et al.*, 2012). Abbildung 1 gibt einen schematischen Überblick über das Modell der MKL1-abhängigen Tumorigenese nach DLC1-Verlust. In hepatozellulären Tumorzelllinien, die den Tumorsuppressor DLC1 nicht exprimieren,

kommt es nach diesem Modell zur Aktivierung von RhoA. Dies führt zu einer konstitutiv nukleären Lokalisation von MKL1 (Mühlich *et al.*, 2012). Über diesen Mechanismus werden MKL1-abhängige Zielgene konstitutiv exprimiert (Mühlich *et al.*, 2012). Durch Ausschalten von MKL1/2 in DLC1-defizienten hepatozellulären Karzinomzelllinien kommt es zu einem Proliferationsstopp sowie zu Verminderung der Zellmigration (Mühlich *et al.*, 2012). Dies stellt einen wichtigen Hinweis dar, dass die transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2 an der Tumorigenese in hepatozellulären Karzinomzellen nach DLC1-Verlust beteiligt sind (Mühlich *et al.*, 2012).

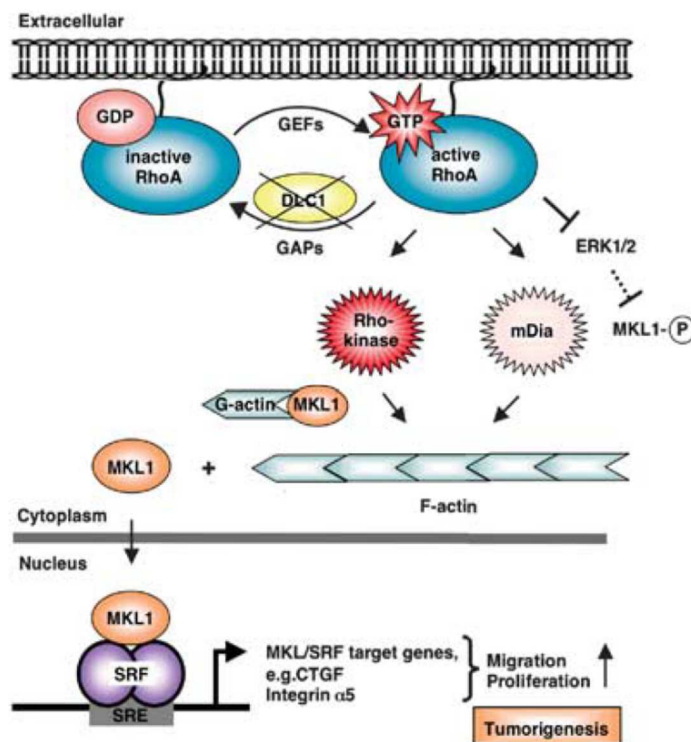


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Modells der MKL1-abhängigen Tumorigenese nach DLC1-Verlust (aus Mühlich *et al.* 2012).

Durch Verlust des GTPase-aktivierenden Proteins DLC1 bleibt RhoA vermehrt in der aktiven, GTP-gebundenen Form. Aktiviertes RhoA führt zu einer Polymerisation von F-Aktin und der daraus resultierenden Freisetzung von MKL1 aus der Bindung an Aktin. MKL1 transloziert in den Zellkern. Dadurch kommt es zur Induktion von SRF (*Serum Response Factor*)-abhängigen Zielgenen via SRE (*Serum Response Elements*). Die so induzierten Zielgene sind an der Tumorigenese beteiligt (nach Mühlich *et al.* (2012)).

A.4 ONKOGEN-INDUZIERTER SENESZENZ IN ABHÄNGIGKEIT VON MKL1/2

Durch Befunde der Arbeitsgruppe, zu denen auch die vorliegende Arbeit einen Beitrag geleistet hat, konnte der Proliferationsstopp nach MKL1/2-Depletion in hepatozellulären Karzinomzellen dem Mechanismus der Onkogen-induzierten Seneszenz zugeordnet werden (Hampl *et al.*, 2013).

Der zelluläre Mechanismus der Onkogen-induzierten Seneszenz wurde erstmals 1997 identifiziert. Serrano *et al.* konnten zeigen, dass durch die Expression des Onkogens Ras in primären Zellen Seneszenz induziert werden kann (Serrano *et al.*, 1997). Der beobachtete Effekt geht mit einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase einher und ist mit einer Akkumulation der Proteine p53 und p16 verbunden (Serrano *et al.*, 1997). Diese Onkogen-induzierte Seneszenz bringt keine Verkürzung der Telomere mit sich (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Wei *et al.* (1999) konnten zeigen, dass auch in Zellen mit aktiver Telomerase Seneszenz-Induktion via *ras* stattfinden kann. Hingegen ist die replikative Seneszenz durch Verkürzungen an den Telomeren gekennzeichnet (Allsopp & Harley, 1995; Stewart *et al.*, 2003a).

Es gibt verschiedene Mechanismen, die Onkogen-induzierte Seneszenz hervorrufen und sich vermutlich nicht gegenseitig ausschließen, die aber zu einer Aktivierung der Proteine p53 und Rb führen (Courtois-Cox *et al.*, 2008). Nach Larsson (2011) gibt es mindestens 3 Signalwege, über die Onkogene Seneszenz induzieren können. Larsson (2011) nennen hier den Arf/p53/p21- sowie den *DNA-Damage-Response* (DDR)-Signalweg und den p16/pRB-vermittelten Signalweg. Aberrante Aktivierung von Onkogenen wie Ras oder Myc führt über die genannten Signalwege zu Onkogen-induzierter Seneszenz (Larsson, 2011).

Befunde der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich zeigen, dass Depletion von MKL1/2 in DLC1-defizienten hepatozellulären Tumorzellen zu Onkogen-induzierter Seneszenz führt, die mit Ras-Aktivierung, erhöhter p16-Expression und hypophosphoryliertem Rb einhergeht (Hampl *et al.*, 2013). Im Zuge der erhöhten Ras-Expression tritt eine erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung auf, dies geschieht im Rahmen der Aktivierung des Raf-MEK1-ERK1/2-Signalwegs nach Ras-Aktivierung (Hampl *et al.*, 2013). ERK1/2,

Extracellular-signal-Regulated Kinase (ERK) 1 und 2 sind an Signaltransduktionswegen, an denen Rezeptortyrosinkinasen mitwirken, beteiligt (Pearson *et al.*, 2001) und wirken als MAP-Kinasen, sog. mitogen-aktivierte Proteinkinasen (Seger & Krebs, 1995).

Die Befunde deuten auf Onkogen-induzierte Seneszenz in MKL1/2-depletierten HuH7-Zellen hin (Hampl *et al.*, 2013). Über welches MKL1/2 und SRF-abhängige Zielgen dieser Effekt vermittelt wird, bleibt jedoch unklar.

A.5 MYOFERLIN ALS POTENTIELLES MKL1-ABHÄNGIGES ZIELGEN

Durch Mikroarray-Analysen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich wurde Myoferlin als ein Gen identifiziert, dessen Expression in MKL1/2-depletierten hepatozellulären Karzinomzelllinien vermindert war (Hermanns *et al.*, 2017). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle von Myoferlin in der Tumorigenese hepatozellulärer Karzinomzellen näher untersucht, auch in Hinblick darauf, ob Myoferlin den Proliferationsstopp im Rahmen des Auftretens Onkogen-induzierte Seneszenz nach MKL1/2-Verlust in DLC1-defizienten Zellen vermittelt.

Myoferlin wurde im Jahr 2000 als Mitglied der Ferlin-Proteinfamilie identifiziert und besitzt eine Molekülmasse von 230 kDa (Davis *et al.*, 2000). Das Protein Myoferlin enthält eine Transmembrandomäne sowie C2-Domänen, die bei Proteinen, die an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind, zu finden sind (Davis *et al.*, 2000; Marty *et al.*, 2013). Myoferlin assoziiert sowohl mit der Plasmamembran als auch mit der Kernmembran (Davis *et al.*, 2000).

Die zelluläre Funktion von Myoferlin wurde bereits in einigen Arbeiten näher untersucht. Es gibt Hinweise darauf, dass Myoferlin an der Muskelentwicklung bzw. Reparaturprozessen im Muskel beteiligt ist (Davis *et al.*, 2002; Demonbreun *et al.*, 2010a). Des Weiteren gibt es Anhaltspunkte, dass Myoferlin an der Endozytose, vor allem an der Calveolae/Lipid Rafts-abhängigen Endozytose und der Clathrin-abhängigen Endozytose, beteiligt ist (Bernatchez *et al.*, 2009). Darüber hinaus haben Bernatchez *et al.*

(2007) im Zellkulturmodell gezeigt, dass Myoferlin in endothelialen Zellen mit der Signaltransduktion über den VEGF-Rezeptor 2 (*Vascular endothelial growth factor-2*) in Zusammenhang steht.

Turtoi *et al.* (2013) haben die Myoferlin-Expression im Mammakarzinom näher untersucht. Dabei konnten sie eine Überexpression von Myoferlin in Tumorproben aus Mammakarzinomen feststellen (Turtoi *et al.*, 2013). Es liegen auch Hinweise vor, dass Myoferlin in Mammakarzinomzelllinien an der Degradation des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors, des EGF-Rezeptors (EGFR), beteiligt ist (Turtoi *et al.*, 2013). Nach Myoferlin-Depletion findet keine Degradation des EGF-Rezeptors in Brustkrebszellen statt (Turtoi *et al.*, 2013). Der Verlust von Myoferlin hat zudem die Inhibition der EGF-vermittelten Zellmigration und Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) zur Folge (Turtoi *et al.*, 2013). Des Weiteren ist die Zellinvasion nach Myoferlin-Depletion vermindert (Turtoi *et al.*, 2013).

A.6 EGF-REZEPTOR

Aufgrund der von Turtoi *et al.* (2013) beschriebenen Regulation des EGF-Rezeptors durch Myoferlin sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob auch in hepatozellulären Karzinomzellen ein Zusammenhang zwischen der Expression des EGF-Rezeptors und Myoferlin besteht.

Der EGF-Rezeptor wird nach Bindung von EGF und Dimerisierung des Rezeptors aktiviert und autophosphoryliert (Schoeberl *et al.*, 2002; Yarden & Schlessinger, 1987). Dadurch wird eine Signaltransduktionskaskade über MAP-Kinasen eingeleitet, die über die Proteine Raf, MEK und ERK zelluläre Proteine und Transkriptionsfaktoren reguliert (Schoeberl *et al.*, 2002). Der EGF-Rezeptor-Signaltransduktionsweg ist an vielen verschiedenen zellulären Prozessen wie Wachstum, Proliferation und Differenzierung beteiligt (Oda *et al.*, 2005). In vielen Karzinomen ist der EGF-Rezeptor überexprimiert (Yarden & Pines, 2012). Tyrosinkinaseinhibitoren, die auf die enzymatische Funktion des EGF-Rezeptors in Tumoren abzielen, wurden bereits entwickelt (Yarden & Pines, 2012). Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom wird beispielsweise Gefitinib eingesetzt, dieser Tyrosinkinaseinhibitor wirkt auch auf die Tyrosinkinaseaktivität des

EGF-Rezeptors (Cohen *et al.*, 2003). Ebenfalls beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) wird Erlotinib eingesetzt, welches die Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors inhibiert (Cohen *et al.*, 2005).

A.7 ZIELSETZUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2, DLC1 und Myoferlin im Hinblick auf die Tumorigenität hepatozellulärer Karzinomzellen näher untersucht. Als Modellsystem dienten humane hepatozelluläre Karzinomzelllinien.

Zunächst wurden die Effekte von MKL1/2 sowie des Tumorsuppressors DLC1 auf das Wachstumsverhalten im Zellkultursystem analysiert. Dabei wurde ein besonderer Fokus auf das autonome Wachstumsverhalten auf Weichagar sowie auf das Zellzyklusverhalten gelegt. Das Zellzyklusverhalten wurde insbesondere im Hinblick auf eine Arretierung in der G1-Phase analysiert, welches ein Hinweis auf einen Proliferationsstopp, eventuell im Rahmen der Induktion von Seneszenz, darstellt (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). Das Wachstumsverhalten auf Weichagar wurde analysiert, um das autonome Zellwachstum der untersuchten Zelllinie zu überprüfen. Die Fähigkeit zu Zellwachstum auf Weichagar ist ein Korrelat der Tumorigenität (Cifone, 1982).

Des Weiteren wurde Myoferlin näher untersucht, da in Vorarbeiten mittels Microarray-Analysen ein Zusammenhang zwischen der Expression von MKL1/2 und Myoferlin hergestellt werden konnte (Hermanns *et al.*, 2017). Das Wachstum der hepatozellulären Karzinomzelllinie HuH7 wurde in Abhängigkeit von Myoferlin analysiert. Dafür wurde Myoferlin mittels RNA-Interferenz dieser Zelllinie ausgeschaltet. Auch hier wurden Zellzyklusanalysen durchgeführt sowie das autonome Wachstumsverhalten auf Weichagar bestimmt. Zusätzlich wurden Expressionsanalysen durchgeführt, um die Auswirkungen einer Myoferlin-Depletion auf zelluläre Signalwege zu untersuchen. Die Expression des EGF-Rezeptors wurde in Abhängigkeit von Myoferlin beurteilt, da in der Literatur nachgewiesen wurde, dass die Depletion von Myoferlin in Brustkrebszelllinien die Degradation des EGF-Rezeptors hemmt (Turtoi *et al.*, 2013).

Auf diese Weise soll die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag dazu leisten, die molekularen Mechanismen der Tumorigenese hepatozellulärer Karzinomzellen näher aufzudecken, um so mögliche Zielstrukturen zukünftiger Therapieansätze zu ermitteln.

B. MATERIAL UND METHODEN

B.1 ZELLKULTUR

B.1.1 Verwendete Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden kommerziell erhältliche Zelllinien verwendet, die auf Lebertumore zurückgehen. Des Weiteren wurden Zelllinien, die auf humane embryonale Nierenzellen zurückgehen eingesetzt, um lentivirale Viruspartikel zur Transduktion hepatozellulärer Karzinomzellen (HuH7-Zellen) herzustellen. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Als hepatozelluläre Tumorzelllinie wurden zum einen HuH7-Zellen eingesetzt, die 1982 von Nakabayashi *et al.* als Zelllinie etabliert wurden. Die Zelllinie geht auf ein chirurgisch reseziertes hepatozelluläres Karzinom eines 57-jährigen japanischen männlichen Patienten zurück, welches als gut differenziertes hepatozelluläres Karzinom beschrieben ist (Nakabayashi *et al.*, 1982). HuH7-Zellen wurden nach Nakabayashi *et al.* (1982) aus einer epithelialen Tumorzellkolonie gewonnen und als tumorigen nach subkutaner Injektion in Nacktmäuse beschrieben. HuH7-Zellen weisen eine Defizienz des Tumorsuppressors DLC1 sowie nukleäre Lokalisation der transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2 auf (Mühlich *et al.*, 2012).

Zum Vergleich wurde die Tumorzelllinie HepG2 hinzugezogen, die den Tumorsuppressor DLC1 exprimiert und zytoplasmatische Lokalisation von MKL1/2 aufweist (Mühlich *et al.*, 2012). Die HepG2-Zelllinie wurde aus einem chirurgischen Resektat eines Tumors eines 15-jährigen männlichen Patienten etabliert (López-Terrada *et al.*, 2009). Dieser Tumor ging auf ein epitheliales Hepatoblastom zurück (López-Terrada *et al.*, 2009).

HEK293T-Zellen wurden verwendet, um lentivirale Konstrukte herzustellen, mit denen das Ausschalten bestimmter Zielsequenzen in HuH7-Zellen erzielt wurde. HEK293-Zellen gehen auf HEK-Zellen, humane embryonale Nierenzellen zurück, die durch Fragmente von Adenovirus Typ 5-DNA transformiert wurden (Graham *et al.*, 1977).

HEK293T-Zellen unterscheiden sich von HEK293-Zellen durch die Expression des SV40 T-Antigens (Thomas & Smart, 2005).

Tabelle 1. In der vorliegenden Arbeit verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung	Kultur-medium +Selektions- antibiotikum	Erhalten von
HuH7	Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie	DMEM	JCRB cell bank (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Osaka, Japan)
HuH7-shRNA-MKL1/2	Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie mit stabiler MKL1/2-Depletion	DMEM +5 µg/ml Puromycin	Für die Versuche C.1.2.3 hergestellt von Frau Dr. Veronika Hampl, für C.3.4 selbst hergestellt im Rahmen der vorliegenden Arbeit
HuH7-Leervektor-shRNA	Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie mit stabil transfiziertem Leervektor	DMEM +5 µg/ml Puromycin	Hergestellt aus HuH7-Zellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit
HuH7-shRNA-Myoferlin	Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie mit stabiler Myoferlin-Depletion	DMEM +5 µg/ml Puromycin	Hergestellt aus HuH7-Zellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit
HepG2	Humane Hepatoblastomzelllinie	RPMI 1640	ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA)
HepG2 MCL	Humane Hepatoblastomzelllinie mit Leervektor	RPMI 1640	Hersteller: Dr. Scott Lowe, Cold Spring Harbor, New York, USA
HepG2-shRNA-DLC1	Humane Hepatoblastomzelllinie mit stabiler DLC1-Depletion	RPMI 1640 + 5 % Penicillin/Streptomycin	Hersteller: Dr. Scott Lowe, Cold Spring Harbor, New York, USA
HepG2-shRNA-MKL1/2	Humane Hepatoblastomzelllinie mit stabiler MKL1/2-Depletion	RPMI 1640 +5 µg/ml Puromycin	Hergestellt von Frau Dr. Veronika Hampl aus HepG2-Zellen
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie mit Adenovirus Typ5-Transformation und SV40-T-Antigen (Graham <i>et al.</i> 1977, Thomas & Smart 2005)	DMEM	ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, USA)

B.1.2 Subkultivierung und Kryokonservierung

MATERIAL

- Ampullen: Cryogefäße 1,6 ml (SarstedtPure G, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Brutschrank HeraCell 240 37 °C, 5 % CO₂ (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)
- DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland): +10 % FBS, + 5 % Penicillin/ Streptomycin
- DMSO (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- FBS, Fetal Bovine Serum (Gibco® Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Gefrierschrank (Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland)
- Kühlschrank (Liebherr, Biberach an der Riss, Deutschland)
- Kryogefäße CryoPure 1,6 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Mikroskop Olympus CKX41 (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland)
- 1 x PBS: 10 x PBS 100 ml, H₂O_{bidest.} 900 ml
- 10 x PBS:
 - 2 g Kaliumchlorid (KCL) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 2 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 80 g Natriumchlorid (NaCl) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 21,6 g Dinatriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄ x 7 H₂O) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - ad 1 l H₂O_{reinst.}, pH 7,4, autoklavieren
- Pipetus (Hirschmann, Eberstadt, Deutschland)
- Penicillin/Streptomycin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Puromycin Dihydrochloride (Calbiochem® Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- RPMI 1640 Kulturmedium (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland), +10 % FBS, +/- Penicillin/ Streptomycin (5 %)
- Serologische Pipetten 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Sterilbank Heraeus HERASafe KS (Thermo Scientific, Schwerte Deutschland)
- Trypsin/EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)-Lösung (0,05 %) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

- Wasserbad (Memmert, Schwabach, Deutschland)
- Zellkulturschalen 35 mm, 6 cm, 10 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Zentrifuge Heraeus Laborfuge 400 (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Zählkammer: Neubauer-Zählkammer (0,1 mm Tiefe) (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland)

DURCHFÜHRUNG

Die Kultivierung der Zellen erfolgt unter sterilen Bedingungen mit auf 37 °C angewärmten Zellkulturreagenzien wie in modifizierter Form bei Gstraunthaler und Lindl (2013) beschrieben. Nach dem Auftauen der Zellen, welche in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert werden, werden diese zunächst in ein mit Vollmedium befülltes Falcon-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (300 x g, 5 min), um das im Einfriermedium enthaltene DMSO aus der Zellsuspension zu entfernen. Das so gewonnene Zell-Pellet wird in Vollmedium gelöst. Die Zellen werden nun in 10 cm-Zellkulturschalen überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % in der Zellkulturschale erfolgt das Subkultivieren der Zellen mit Trypsin/EDTA. Durch Trypsin werden die Zellen von der Adhäsion an das Kulturgefäß in Lösung gebracht, EDTA trennt die Verbindungen der Zellen untereinander (Gstraunthaler & Lindl, 2013). Zur Subkultivierung der Zellen wird zunächst das Kulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen (eingesetzte Mengen vgl. Tabelle 2). Daraufhin werden die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA und anschließende Inkubation im Brutschrank bei 37 °C für vier Minuten von der Zellkulturschale abgelöst. Unter dem Mikroskop wird im Anschluss daran überprüft, ob alle Zellen resuspendiert sind. Anschließend werden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Trypsinreaktion wird durch Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium gestoppt. Eine Schädigung der Zellen durch zu lange Trypsineinwirkung sollte vermieden werden (Gstraunthaler & Lindl, 2013). Anschließend erfolgt die Bestimmung der Zellzahl mithilfe der Neubauer- Zählkammer. Die gewünschte Anzahl an Zellen wird nun mit Zugabe von Medium in eine neue Zellkulturschale ausgesät.

Um die Zellen langfristig einzulagern, werden diese bei -196 °C in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Zum Einfrieren der Zellen wird eine Zellkulturschale wie beschrieben

trypsiniert (siehe oben) und anschließend abzentrifugiert (300 x g, 5 min). Das so gewonnene Pellet wird in 1,8 ml Serum (Fetal Bovine Serum) resuspendiert, mit 200 µl DMSO (Dimethylsulfoxid) versetzt und die so hergestellte Suspension auf vier Einfrierampullen à 500 µl verteilt. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen in den Zellen und wirkt zudem einer Dehydratation entgegen (Gstraunthaler & Lindl, 2013). Serum hat einen protektiven Effekt auf die Zellen (Gstraunthaler & Lindl, 2013). Zunächst werden die Zellen langsam abgekühlt um dann bei -80 °C gelagert zu werden. Nach einigen Tagen werden die Einfrierampullen in einen -196 °C Stickstofftank überführt.

Tabelle 2. Eingesetzte Lösungen zur Subkultivierung der Zelllinien.

Kulturschale	PBS	Trypsin/EDTA	Medium mit Serumgehalt
3 cm	2 ml	1 ml	3 ml
6 cm	4 ml	2 ml	4 ml
10 cm	8 ml	3 ml	6 ml

B.2 RNA-INTERFERENZ MITTELS shRNA

RNA-Interferenz wird eingesetzt, um mittels doppelsträngiger RNA die Expression von Zielgenen zu reduzieren (Conklin, 2003). Durch doppelsträngige RNA wird dabei gezielt eine mRNA-Zielsequenz ausgeschaltet (Fire *et al.*, 1998; Svoboda *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde RNA-Interferenz mittels shRNA, „*short hairpin RNA*“, eingesetzt. „*Short hairpin RNAs*“ (shRNAs) sind RNA-Spezies, die innerhalb des RNA-Moleküls komplementäre Strukturen aufweisen (Moore *et al.*, 2010). Nach dem Einbringen der shRNA-Sequenz in Zielzellen integriert diese in die DNA der Zielzelle (Moore *et al.*, 2010). Nach der Transkription werden die shRNA-Sequenzen im Cytosol durch das Enzym „*Dicer*“ zu siRNA (small interfering RNA)-Duplexen umgewandelt (Moore *et al.*, 2010). Diese siRNA bindet an die Ziel-mRNA-Strukturen, wodurch der Abbau dieser Strukturen eingeleitet wird (Moore *et al.*, 2010). Mittels shRNA wird eine langfristige Depletion erzielt (Moore *et al.*, 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurden lentivirale Vektorsysteme verwendet, um shRNA in hepatozelluläre Karzinomzelllinien einzubringen. Dabei werden zunächst mittels Calcium-Phosphat-Transfektion shRNA-enthaltende lentivirale Vektoren in HEK293T-

Zellen hergestellt. Diese shRNA-enthaltenden lentiviralen Partikel können als Überstand von HEK293T-Zellen abgenommen werden und dienen der Infektion von HuH7-Zellen, indem sie die shRNA-Sequenzen in HuH7-Zellen einbringen.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertationsarbeit wurde RNA-Interferenz eingesetzt, um die Expression von Myoferlin in HuH7-Zellen auszuschalten. In weiteren Versuchen wurden MKL1/2 in HuH7-Zellen mittels RNA-Interferenz depletiert. Um zu überprüfen, welche Effekte die lentivirale Transduktion auf die untersuchten Zelllinien hat, wurde mittels lentiviraler Transduktion eine nicht-zielgerichtete shRNA-Sequenz in HuH7-Zellen eingebracht und somit eine Kontrollzelllinie mit Leervektor-Konstrukt hergestellt.

B.2.1 Calcium-Phosphat-Transfektion

Mittels Calcium-Phosphat-Transfektion wurden in der vorliegenden Arbeit HEK293T-Zellen mit Viruspartikeln sowie einem Plasmid, das die shRNA-Sequenz eines bestimmten Zielgens enthält inokuliert, um shRNA-enthaltende lentivirale Vektoren herzustellen.

Die Calcium-Phosphat-Transfektion wurde von Graham und van der Eb (1973) etabliert. Nach Graham und van der Eb (1973) bilden sich durch das Suspendieren von DNA in Phosphat-haltiger Lösung und Zugabe von Calciumchlorid Präzipitate der DNA mit Calcium-Phosphat-Partikeln. In dieser Form kann die DNA in die Zielzellen aufgenommen werden (Graham & van der Eb, 1973). In der vorliegenden Arbeit wurde für die Calcium-Phosphat-Transfektion ein Protokoll für HEK293T-Zellen verwendet, wie es in modifizierter Form bei Jordan *et al.* (1996) beschrieben ist.

Die mittels Calcium-Phosphat-Transfektion hergestellten lentiviralen Vektoren sind replikations-defiziente Viruspartikel, die sich aus Core-Proteinen und Enzymen von Lentiviren sowie den Hüllproteinen von anderen Viren zusammensetzen (Naldini, 1998). Das Hüllprotein geht zumeist auf das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) zurück (Naldini, 1998). Lentiviren zählen zu den retroviralen Vektoren, welche so konstruiert sind, dass das virale Genom nicht auf die Zielzelle übertragen wird (Naldini, 1998).

MATERIAL

- 2 x HBS (Hepes Buffered Saline):
8 g Natriumchlorid (NaCl) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
0,2 g Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$) (1,5 M Phosphat) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
6,5 g HEPES (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland),
pH 7,0; auf 500 ml mit destilliertem Wasser auffüllen und pH erneut kontrollieren
- 2 M CaCl_2 :
87,6 g $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 200 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, steril filtrieren
- Kulturmedium: DMEM mit 10 % FBS, ohne Zusatz von Antibiotika
- New Brunswick™ Gefrierschrank (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Plasmide/shRNA (vgl. Tabelle 3)
- Reagiergefäße 5 ml (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Vortexmischer Vortex-Genie (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)

Tabelle 3. Zur Calcium-Phosphat-Transfektion eingesetzte Plasmide/ shRNA.

Plasmid/ shRNA	Hersteller
pCMV-dR8.91	Erhalten von Ron Prywes, Columbia University, New York, USA
pCMV-VSV-G	Bob Weinberg (Stewart <i>et al.</i> , 2003b)
shRNA Leervektor SHC002	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
(pLKO.1-Vektor mit Puromycin-Resistenzgen)	
shRNA MKL1/2 (pLKO.1-Vektor)	Ron Prywes (Lee <i>et al.</i> , 2010)
shRNA Myoferlin (pLKO.1-Vektor)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

DURCHFÜHRUNG

Für die Calcium-Phosphat-Transfektion werden zunächst HEK293T-Zellen auf 6 well-Platten ausgesät ($7,5 \times 10^5$ Zellen/well). Zwei Stunden vor der Transfektion wird das Medium gewechselt und DMEM-Medium ohne Zusatz von Antibiotika zugegeben. Pro Abschnitt der 6 well-Platte wird folgender Ansatz zusammenpipettiert:

2 M CaCl_2	3,5 μl
pCMV-dR8.91	0,75 μg
pCMV-VSV-G	0,25 μg
shRNA	1 μg
ddH ₂ O (steril filtriert)	ad 62,5 μl

Der so gewonnene DNA-CaPO₄-Mix wird zu 62,5 µl 2 x HBS tropfenweise pipettiert, während die Mischung schüttelnd auf dem Vortexmischer inkubiert wird. Die Reaktionsmischung wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise auf HEK293T-Zellen pipettiert.

Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden wird das Kulturmedium gewechselt (Zugabe von Medium ohne Penicillin/Streptomycin). Am darauffolgenden Tag wird der lentivirale Überstand abgenommen und für die lentivirale Transduktion präpariert. Nicht benötigter lentiviraler Überstand kann bei -80 °C dauerhaft gelagert werden. Nach 24 weiteren Stunden kann ein zweiter lentiviraler Überstand abgenommen werden und ebenfalls bei -80 °C gelagert werden.

B.2.2 Lentivirale Transduktion

In der vorliegenden Arbeit wurden shRNA-Konstrukte mittels lentiviraler Vektoren in hepatozelluläre Karzinomzelllinien eingebracht, um dadurch eine Depletion bestimmter Zielsequenzen zu erreichen.

MATERIAL

- Polybrene (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Puromycin Dihydrochloride, Calbiochem® (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Filtropur S Sterilfilter 0,45 µm Porengröße (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

DURCHFÜHRUNG

Zur lentiviralen Transduktion werden zunächst 4 ml des analog B.2.1 gewonnenen lentiviralen Überstandes filtriert. Hierbei wird ein Filter mit 0,45 µm Porengröße verwendet. Der gefilterte Überstand wird mit 8 µl Polybrene (4 mg/ml, sterilfiltriert) versetzt. Polybrene ist ein kationisches Polymer welches die Adsorption und Transduktionseffizienz verbessert (Davis *et al.*, 2004). 4 ml dieses Überstandes werden auf eine 6 cm-Schale, in der am Tag zuvor HuH7-Zellen ausgesät wurden, gegeben. Nach 3 h werden 4 ml Kulturmedium (ohne Antibiotikazusatz) hinzugefügt, um den für die Zellen toxischen Überstand zu verdünnen. Nach weiteren 5 h werden nochmals 8 ml Medium zu-

gegeben. Die Zellen können am nächsten Tag passagiert oder für weitere Versuche herangezogen werden. Dabei sollte die Zugabe des Selektionsantibiotikums Puromycin zum Kulturmedium erfolgen, um stabil transduzierte Zellen zu selektionieren, da das für die Transduktion verwendete Plasmid ein Puromycin-Resistenzgen enthält. Puromycin interferiert mit der Proteinbiosynthese und behindert dadurch das Zellwachstum (Darken, 1964). In den durchgeführten Versuchen wurden 5 µg/ml Puromycin zur Selektion zugesetzt.

B.3 TRANSIENTE TRANSFEKTION MIT LIPOFECTAMINE® 2000

Die Lipofectamine-Transfektion wurde zum transienten Einbringen von Plasmid-Konstrukten in hepatozelluläre Karzinomzelllinien verwendet. Dabei wirkt Lipofectamine als kationisches Liposomen-basiertes Transfektionsreagenz, das mit Nukleinsäuren komplexiert (Dalby *et al.*, 2004). Dadurch können Nukleinsäuren sehr effizient in Zellen aufgenommen werden (Dalby *et al.*, 2004). Die Transfektion mit Lipofectamine® 2000 erfolgte modifiziert nach den Herstellerangaben von Invitrogen.

MATERIAL

- Lipofectamine® 2000 Reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Opti-MEM, Gibco® (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Plasmide, vgl. Tabelle 4
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Zellkulturmaterialien siehe B.1.2

Tabelle 4. Zur Transfektion mit Lipofectamine ® 2000 eingesetzte Plasmide.

Plasmid	Hersteller	Konzentration
p3x FLAG MKL1	Ron Prywes (Cen <i>et al.</i> , 2003)	219,3 µg/ml
pCDNA3.1-Myoferlin HA	William Sessa (Bernatchez <i>et al.</i> , 2007)	585,2 µg/ml

DURCHFÜHRUNG

Für die Transfektion einer 6 cm-Zellkulturschale wird eine Menge von 2 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Die Plasmid-DNA wird für eine 6 cm-Zellkulturschale in 500 µl OPTI-MEM- Medium gelöst. In einem separaten Ansatz werden 10 µl Lipofectamine® 2000

mit 500 µl OPTI-MEM-Medium vermischt. Es erfolgt eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach dieser Inkubationszeit werden die in OPTI-MEM gelöste Plasmid-DNA sowie die Lösung von Lipofectamine® 2000 in OPTI-MEM durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinigt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieses Inkubationsschrittes wird bei den zu transfizierenden Zellen Medium gewechselt und die Zellen pro 6 cm-Zellkulturschale mit 4 ml OPTI-MEM versetzt. Nach der 20-minütigen Inkubationszeit wird die Plasmid-DNA/Lipofectamine® 2000-Mischung auf die Zellen gegeben. Es erfolgt eine 4-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Im Anschluss wird das Medium gewechselt, die Zellen werden nun mit Vollmedium weiter kultiviert.

B.4 WEICHAGARTEST (ANCHORAGE INDEPENDENT COLONY ASSAY)

Der „*Anchorage Independent Colony Assay*“ oder Weichagartest geht in modifizierter Form auf Experimente von Sanders und Burford (1964) zurück. Das hier verwendete Protokoll wurde von Dr. Ludwig Hieber, Helmholtz Zentrum München, zur Verfügung gestellt.

Der Weichagartest dient der Charakterisierung einer Zelllinie im Hinblick auf die Fähigkeit zu autonomem Zellwachstum. Es wird beurteilt, ob die Zelllinie unabhängig von der Anheftung an eine Zellkulturschale zur Proliferation fähig ist. Die Fähigkeit zum Wachstum unabhängig von der Adhäsion an eine Zellkulturschale ist charakteristisch für Tumorzelllinien (Cifone, 1982). Zellen, die nicht maligne transformiert sind, proliferieren im Gegensatz dazu *in vitro* nur nach Adhäsion an eine Oberfläche, etwa einer Zellkulturschale (Cifone, 1982).

Für den Weichagartest wird zunächst eine zellfreie, Kulturmedium enthaltende Agar-schicht (6 % -iger Agar) ausplattiert, auf diese Schicht wird eine niedriger konzentrierte Schicht Agar (3 % -iger Agar) aufgetragen, welche die zu untersuchenden Zellen enthält. Das Wachstumsverhalten wird über einen bis zu 3 Wochen dauernden Zeitraum beurteilt.

MATERIAL

- 6 % Agar: 3 g Difco™-Agar (BD), 1 g Bacto™-Pepton (BD), 50 ml H₂O_{bidest}
- 3 % Agar: 1,5 g Difco™-Agar (BD), 0,5 g Bacto™-Pepton (BD), 50 ml H₂O_{bidest}
- Filter zum Sterilfiltrieren: Filtropur S 0,2 µm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Mikrowelle (Daewoo, Seoul, Korea)
- Mikroskop Olympus CKX41 (Olympus Deutschland GmbH Hamburg, Deutschland)
- Iodonitrotetrazoliumchlorid (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Hanks's Balanced Salt Solution (Hank's BSS) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- PBS 1 x (vgl. B.1.2)
- Zellkulturschalen ø 6 cm (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Trypsin- EDTA (vgl. B.1.2)
- Vollmedium (vgl. B.1.2)
- Wasserbad (Memmert, Schwabach, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

DURCHFÜHRUNG

Zunächst werden Agarlösungen verschiedener Konzentrationen (6 % und 3 %) vorbereitet und autoklaviert. Für die 6 %-ige Schicht, die als Grundlage dient, werden zunächst Zentrifugenröhrchen mit 18 ml Kulturmedium befüllt und im Wasserbad auf 37 °C erhitzt. Der 6 %-ige Agar wird mithilfe einer Mikrowelle verflüssigt. 2 ml des verflüssigten Agars werden zu dem auf 37 °C vorgewärmten Kulturmedium (18 ml) pipettiert und jeweils 4 ml dieser Suspension auf 6 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Nach dem Aushärten des 6 %-igen Agars kann die obere, 3 %-ige Agarschicht aufgebracht werden, die die Zellen enthält. Für den Weichagartest werden Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen ausplattiert. In der vorliegenden Arbeit wurden pro Zelllinie zehn Zellkulturschalen à 2×10^4 sowie zehn Zellkulturschalen mit 4×10^4 Zellen ausgesät. Für die 3 %-ige Agarschicht werden Zentrifugenröhrchen mit 8 ml Kulturmedium befüllt. Die zu untersuchenden Zellen werden durch Trypsin/EDTA von der Kulturschale gelöst (vgl. B.1.2). Vor und nach Beendigung der Trypsininkubation sollten die Zellen

durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut vereinzelt werden. Dies ist nötig, da die Zellen für den Weichagartest möglichst einzeln auf dem Agar aufgetragen werden sollen. Die Zellen werden so in Medium aufgenommen, dass sich die gewünschte Zellzahl in 1 ml Medium befindet. Diese Zellsuspension wird bei 37 °C im Wasserbad warm gehalten. Zu den in Zentrifugenröhrchen vorbereiteten 8 ml Kulturmedium wird nun zunächst 1 ml des 3 % -igen Agars gegeben, der in der Mikrowelle verflüssigt wurde. Anschließend wird 1 ml der Zellsuspension zugegeben, gemischt und 2 ml dieser Suspension auf die ausgehärtete 6 % -ige Agarschicht ausplattiert. Der Weichagartest wird kurz bei Raumtemperatur inkubiert, bis auch die obere Schicht erhärtet ist. Anschließend erfolgt die Inkubation bei 37 °C im Brutschrank für ca. drei Wochen. Alle 10 Tage wird pro Zellkulturschale 1 ml Kulturmedium zugegeben, um dem Austrocknen entgegenzuwirken. Nach ca. drei Wochen wird die Koloniebildung unter dem Mikroskop beurteilt und der Weichagartest gefärbt. Dabei sollte die Färbelösung jedes Mal frisch angesetzt werden. Zur Färbung wird 1 mg/ml Iodonitrotetrazoliumchlorid mit Hank's BSS vermischt. Die Lösung wird kurz schüttelnd inkubiert bis sich der Farbstoff vollständig löst. Vor dem Färben der Zellen wird die Färbelösung sterilfiltriert und auf 37 °C erwärmt. Auf jede Zellkulturschale wird 1 ml Färbelösung pipettiert. Nach 24 h sind die Kolonien gefärbt und können unter dem Mikroskop ausgewertet werden sowie eingescannt oder mithilfe einer Digitalkamera abfotografiert werden. Die statistische Auswertung erfolgt mithilfe des Programms „Prism 6“ der Firma Graph Pad, La Jolla, USA (vgl. B.8).

B.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Analyse der Verteilung von Zellpopulationen auf verschiedene Zellzyklusphasen wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde ein modifiziertes Protokoll nach Nüsse *et al.* (1990) verwendet, dass freundlicherweise von Herrn Dr. Ludwig Hieber, Helmholtz Zentrum München, zur Verfügung gestellt wurde.

Im Durchflusszytometer werden die in Suspension befindlichen Zellen vereinzelt und so durch einen Laserstrahl geleitet (Schütt & Bröker, 2011). Die Vorwärtsstreuung wird gemessen, um die Größe der Zellen zu ermitteln, die Seitwärtsstreuung ist der Parameter, durch den die Granularität der Zellen gemessen wird (Böck *et al.*, 1997). Die für die

durchflusszytometrischen Analysen verwendeten Zellen wurden mit dem Farbstoff Propidiumiodid behandelt. Propidiumiodid ist ein basischer Farbstoff, der in den Zellkern gelangt und in die DNA interkaliert (Gstraunthaler & Lindl, 2013). Dadurch kann der DNA-Gehalt der gemessenen Zellen ermittelt werden und so bestimmt werden, in welcher Zellzyklusphase sich die analysierten Zellen befinden (Gstraunthaler & Lindl, 2013). Die Zellen weisen in der G1-Phase des Zellzyklus einen diploiden Chromosomensatz auf (2n). Da in der S-Phase des Zellzyklus die DNA-Replikation stattfindet, ist der DNA-Gehalt in der G2-Phase verdoppelt (4n) (Gstraunthaler & Lindl, 2013). Durch die durchflusszytometrischen Analysen kann eine Arretierung des Zellzyklus in bestimmten Phasen untersucht werden. Zellen, die in die Seneszenz eingetreten sind, weisen in durchflusszytometrischen Analysen eine Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus auf (Sherwood *et al.*, 1988).

MATERIAL

- Durchflusszytometer BD FACS Calibur™ Flow Cytometer (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland)
- CellQuest Pro™ Software (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland)
- FlowJo Software (Tree Star Inc, Ashland, USA)
- Lösung I:
 - 584 mg/l Natriumchlorid (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 1 g/l Natriumcitrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 - 0,3 ml/l Nonident P-40 (=Igepal, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Lösung II:
 - 15 g/l Zitronensäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
 - 0,25 M Saccharose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- RNase A 20 mg/ml (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- PBS (1 x) (vgl. B.1.2)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Zentrifuge Heraeus Laborfuge 400 (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)

DURCHFÜHRUNG

Zunächst werden Lösung I (enthält Natriumchlorid, Natriumcitrat, Nonident P-40, siehe oben) und Lösung II (enthält Zitronensäure und Saccharose, siehe oben) hergestellt. Für

die Analyse des Zellzyklus mittels Durchflusszytometrie wird die zu untersuchende Zelllinie trypsiniert und anschließend bei 300 x g 6 min abzentrifugiert. Im Anschluss daran wird der Überstand abgenommen und das so erhaltene Pellet mit 3 ml 1 x PBS gewaschen. Anschließend wird nochmals zentrifugiert (300 x g, 6 min). Nach Abnahme des Überstands wird das Pellet nun in 1 ml Lösung I aufgenommen. Nun werden 2,5 µl RNase A zugegeben, um die in den Proben vorhandene RNA zu degradieren, da Propidiumiodid sowohl in DNA als auch in RNA interkaliert (Krishan, 1975). Anschließend erfolgt die Zugabe von Propidiumiodid (5 µl), ab diesem Arbeitsschritt sollte im Dunkeln gearbeitet werden. Im Anschluss an eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur wird 1 ml Lösung II zu der Zellsuspension gegeben. Daraufhin werden 5 µl Propidiumiodid zugefügt und anschließend 30 min inkubiert. Bis zur Messung kann die Probe nun bei 4 °C gelagert werden. Die Messung erfolgte am „FACS Calibur™ Flow Cytometer“ der Firma BD am Immunologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Reinhard Obst, Institut für Immunologie München. Bei der Messung am Durchflusszytometer wurde die Software „CellQuest Pro™“ der Firma BD verwendet. Für die Analyse der Daten wurde das Programm „FlowJo“ der Firma FlowJo LLC, Ashland, USA, verwendet, durch das mithilfe des „Cell Cycle“-Tools die Zellzyklusverteilung graphisch dargestellt werden kann. Bei Anwendung des „Cell Cycle“-Tools erfolgte die Auswertung der Zellzyklusverteilung mithilfe des im Programm enthaltenen „Dean-Jett-Fox“-Models. Dieses Model geht auf die Befunde von Dean und Jett zurück, die 1974 eine mathematische Methode entwickelten, um die Zellzyklusverteilung auf die verschiedenen Zellzyklusphasen zu berechnen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm „Prism 6“ der Firma GraphPad, La Jolla, USA.

B.6 NACHWEIS DER β -GALACTOSIDASE-AKTIVITÄT

Der Nachweis der β -Galactosidase-Aktivität dient der Identifizierung von Zellen, die in die Seneszenz eingetreten sind. Diese Nachweismethode geht auf Dimri *et al.* (1995) zurück. Dimri *et al.* (1995) konnten zeigen, dass seneszenten Zellen das Enzym β -Galactosidase exprimieren, dessen Seneszenz-assoziierte Aktivität typischerweise bei einem

pH-Wert von 6 nachgewiesen werden kann. Nach Inkubation mit einer X-Gal enthaltenen Färbelösung erscheinen die seneszenten, β -Galactosidase-exprimierenden Zellen blau gefärbt (Dimri *et al.*, 1995). Die Blaufärbung entsteht durch Bildung eines blauen Präzipitats nach Spaltung von X-Gal (Dimri *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde für den Nachweis des β -Galactosidaseaktivität ein kommerziell erhältlicher Kit der Firma Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA eingesetzt.

MATERIAL

- DMF (N-N-Dimethylformamid) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- 70 % Glycerol (Glycerol 99,5 %, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland; H₂O_{bidest})
- Inkubator 37 °C, ohne CO₂-Atmosphäre (Therma Scientific Max Q 6000)
- Mikroskop Olympus CKX41 (Olympus Deutschland GmbH Hamburg, Deutschland)
- 1 x PBS (vgl. B.1.2)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (aus Polypropylen) (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)
- Zentrifugenröhrchen 15 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) (Material Polypropylen)

DURCHFÜHRUNG

Zur Vorbereitung sollten die im Kit enthaltenen 10-fach konzentrierten Fixierungs- und Färbelösungen mit destilliertem Wasser zu 1-fach konzentrierten Lösungen verdünnt werden. Zudem werden 20 mg des im Kit enthaltenen X-Gal in 1 ml DMF gelöst. Für jede 35 mm-Schale wird folgende Färbelösung vorbereitet:

930 μ l	1 x Staining Solution
10 μ l	Staining Supplement A
10 μ l	Staining Supplement B
50 μ l	20 mg/ml X-Gal in DMF

Zunächst wird das Kulturmedium von den zu färbenden Zellen entfernt. Die Kulturschale wird einmal mit 1 x PBS gewaschen (eingesetzte Menge für 35 mm Schale: 2 ml). Danach wird 1 ml der zuvor verdünnten, 1-fach konzentrierten Fixierungslösung zugegeben. Durch 15-minütigen Inkubation werden die Zellen auf der Kulturschale fixiert. Anschließend wird zweimal mit jeweils 2 ml 1 x PBS gewaschen. Zu jeder 35 mm-

Schale wird nun 1 ml der zuvor hergestellten Färbelösung (siehe oben) gegeben. Die so behandelten Zellkulturschalen werden über Nacht bei 37 °C in einem Inkubator ohne CO₂-Atmosphäre gelagert. Am nächsten Tag wird die ggf. aufgetretene Blaufärbung unter dem Mikroskop beurteilt. Zur dauerhaften Lagerung kann die Färbelösung abgesaugt werden und die Zellen mit 70 % Glycerol überschichtet werden. Die dauerhafte Lagerung erfolgt bei 4 °C.

B.7 EXPRESSIONSANALYSEN MITTELS WESTERN BLOT

Zum Nachweis der Expression von Proteinen wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Die Methode des Western Blots geht auf Towbin *et al.* (1979) zurück. Im Folgenden wurde ein modifiziertes Protokoll nach Burnette (1981) verwendet. Beim Western-Blotting werden mithilfe eines SDS- (*Sodium-Dodecyl-Sulfate*) Polyacrylamidgels elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine Membran überführt und immobilisiert (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979). Anschließend erfolgt der quantitative Nachweis der Proteine durch Antikörper (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1979).

B.7.1 Zellernte für Western Blot

Um die Proteine aus den Zellen isolieren zu können, werden die Zellen zunächst in Gegenwart von Proteaseinhibitoren lysiert. Zur Zelllyse wurde ein Protokoll wie bei Mühlich *et al.* (2008) beschrieben in modifizierter Form eingesetzt. Die Proteinkonzentration wird anschließend photometrisch bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration geht auf die Methode von Bradford (1976) zurück.

MATERIAL

- Bradford-Reagenz Roti®-Quant (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- DTT (Dithiothreitol): 0,25 M DTT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland): 385,5 mg/ 10 ml H₂O, steril filtrieren
- Kälzentrifuge Centrifuge 5424R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Lysis-Puffer:
 - 5 ml 50 mM Hepes (pH=7,4) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 3 ml 150 mM NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 1 ml 1 % Triton X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 0,2 ml 1 mM EDTA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 10 ml 10 % Glycerol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - ad 100 ml H₂O_{reinst}
- 1 x PBS vgl. B.1.2
- Photometer BioPhotometer plus (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
0,25 M PMSF: 435,5 mg PMSF/ 10,9 ml Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

- Protease Inhibitor Cocktail Set III (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- UV-transparente Einmalküvetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)

DURCHFÜHRUNG

Zur Proteinernte werden zu 1 ml Lysispuffer 2 µl 0,25 M PMSF, 4 µl 0,25 M DTT und 10 µl Protease-Inhibitor Cocktail Set III pipettiert. PMSF ist ein Protease-Inhibitor, DTT bewirkt die Auflösung von Disulfidbrücken (Dechert, 2012). Die Zellen werden zunächst zweimal mit eiskaltem PBS (1x) gewaschen. Anschließend wird der vorbereitete Lysispuffer zugegeben. Je nach Größe der Zellkulturschale und Konfluenz der zu erntenden Zelllinie werden folgende Mengen eingesetzt:

3,5 cm Zellkulturschale	80 – 100 µl Lysispuffer
6 cm Zellkulturschale	160 – 200 µl Lysispuffer
10 cm Zellkulturschale	250 – 300 µl Lysispuffer

Die Zellen werden mithilfe eines Zellschabers von den Zellkulturschalen gelöst. Das Lysat wird in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis 15 min lysiert. Nach der Zelllyse auf Eis folgt ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt (15.000 x g, 4 °C). Nach der Zentrifugation wird der proteinhaltige Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat kann zur dauerhaften Lagerung bei -20 °C eingefroren werden. Für die anschließende Western Blot-Analyse wird die Proteinkonzentration des Lysats bestimmt, um zu gewährleisten, dass jeweils eine äquivalente Proteinmenge pro Versuch eingesetzt wird. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration werden 2 µl des Lysats mit 1 ml Bradford-Reagenz (Roti®-Quant, 1:5 in H₂O_{dest} verdünnt) vermischt, welches den Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 enthält. Coomassie Brilliant Blue-G250 bindet an Proteine (Bradford, 1976). Dadurch wird eine Veränderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm auf 595 nm ausgelöst (Bradford, 1976). Die photometrische Messung der Absorption bei 595 nm dient der Quantifizierung der Proteinmenge. Zum Vergleich wird die Absorption einer Leerprobe mit 2 µl Lysispuffer auf 1 ml verdünntem Bradford-Reagenz am Photometer bestimmt. Über die Absorption der proteinenthaltenden Proben bei 595 nm wird die gewünschte Auftragsmenge errechnet.

B.7.2 Protein-Präparation

Um die Proben anschließend auf ein SDS-Polyacrylamidgel auftragen zu können, wird die gewünschte Menge der in B.7.1 gewonnenen Proteine mit Protein-Probenpuffer versetzt. Dieser enthält sowohl Natriumdodecylsulfat (SDS) als auch β -Mercaptoethanol. Durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) werden Proteine denaturiert und es wird eine negative Gesamtladung eingeführt (Dechert, 2012). Dadurch erfolgt die elektrophoretische Auftrennung allein nach Größe des Proteins (Dechert, 2012). Das Einwirken von β -Mercaptoethanol auf die Proben bewirkt die Lösung von Disulfidbindungen in den Proteinen (Dechert, 2012).

MATERIAL

- Heizblock/ Schüttler: Thermomixer compact (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- 4x Proteinprobenpuffer:
 - 8 ml 1 M Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) pH 8.8 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland),
 - 16 ml 20 % Natriumdodecylsulfat (SDS) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 16 ml Glycerol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 320 μ l 0.5 M EDTA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - + Bromphenolblau (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- β -Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg, Deutschland)

DURCHFÜHRUNG

Der SDS-haltige Proteinprobenpuffer wird mit β -Mercaptoethanol versetzt (960 μ l 4 x Proteinprobenpuffer + 40 μ l β -Mercaptoethanol). Zu der gewünschten Menge des in B.7.1 gewonnenen Proteinlysats wird im Verhältnis 4:1 Proteinprobenpuffer gegeben. Die Mischung aus Probe und Proteinprobenpuffer wird 10 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Im Anschluss daran kann das Lysat auf ein Gel aufgetragen werden oder bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

B.7.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Auf einem denaturierenden, diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgel werden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt (Bade *et al.*, 2012). Dabei erfolgt die Auftrennung

nach dem relativen Molekulargewicht (Burnette, 1981). Das Polyacrylamidgel setzt sich aus einem Trenn- und einem Sammelgel zusammen (Dechert, 2012).

MATERIAL

- Ammoniumperoxodisulfat (APS) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Elektrophorese und Blotting-Apparatur: Mini Protean® Tetra Cell (Bio-Rad, München, Deutschland)
- H₂O_{bidest}
- 1 x Laufpuffer
10 x Laufpuffer 100 ml
H₂O_{bidest} ad 1000 ml
- 10 x Laufpuffer
30,26 g Tris (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
143,20 g Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
10 g SDS (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
H₂O_{bidest} ad 1000 ml
- Marker: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)
- Power Supply EV231 (Peglab, Erlangen, Deutschland)
- Rotiphorese®-Gel 30 (37,5:1) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- SDS (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Tris (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

DURCHFÜHRUNG

Die Gele werden mithilfe einer Gelapparatur (Biorad) gegossen. Zunächst wird hierbei das Trenngel in die Apparatur pipettiert (Zusammensetzung vgl. Tabelle 5) und bis zum Aushärten mit H₂O_{bidest} überschichtet, um einen gerade abschließenden Rand nach dem Aushärten zu erreichen. Es erfolgt eine 20-minütige Inkubation, in der die Polymerisation des Gels stattfindet. Auf das Trenngel wird das Sammelgel aufgebracht. In das Sammelgel wird ein Kamm eingesetzt, um dadurch Taschen für das Auftragen der Proben

zu formen. Nach dem Aushärten des Sammelgels können die Gele bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden 10 % -ige Trenngele verwendet (vgl. Tabelle 5).

Zum Probenauftrag wird das Gel in die dafür vorgesehene Laufapparatur eingespannt und in der Laufkammer befestigt. Die Laufkammer wird mit Laufpuffer (1 x) gefüllt. Nun werden die Proben in die Taschen des Gels aufgetragen, hierbei wird pro Gel immer dieselbe Menge Protein aufgetragen. Zusätzlich wird zur Bestimmung des Molekulargewichts ein Marker aufgetragen (8 µl Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei konstant 100 V und 350 mA etwa für 1 Stunde 40 min, bis die Laufront ca. 1 cm vom unteren Ende des Gels entfernt ist.

Tabelle 5. Zusammensetzung des Trenngels. (Mengenangaben für 2 Gele)

	10 % -iges Trenngel
H ₂ O	3,97 ml
30 % Acrylamid (Rotiphorese®-Gel 30)	3,33 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml
10 % SDS	100 µl
10 % APS	100 µl
TEMED	4 µl

Tabelle 6. Zusammensetzung des Sammelgels. (Mengenangabe für 2 Gele)

	Sammelgel
H ₂ O	5,4 ml
30 % Acrylamid	1,34 ml
1 M Tris pH 6,8	2 ml
10 % SDS	80 µl
10 % APS	80 µl
TEMED	8 µl

B.7.4 Immobilisierung der Proteine auf einer PVDF-Membran (Wet-Blot)

Im Folgenden Schritt werden die im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Die hierzu verwendete Methode des sog. „Wet-Blots“ oder „Tank-Blots“ (Bade *et al.*, 2012) geht auf Towbin *et al.* (1979) zurück. Es wurde eine PVDF-Membran verwendet, die sich durch eine hohe Proteinbindekapazität auszeichnet (Bade *et al.*, 2012).

MATERIAL

- Blotting Apparatur Mini Protean® Tetra Cell (Bio-Rad, München, Deutschland)
- Filterpapier (Whatman- Papier, Optilab, München, Deutschland)
- 5 % Magermilchpulver (Heirler, Radolfzell, Deutschland) in TBS-T
- PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran (Millipore, Schwalbach, Deutschland)
- Schüttler Polymax 1040 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
- 5 x Transferpuffer
 - 7,25 g Tris (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 3,65 g Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 0,47 g SDS (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 200 ml Methanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - ad 1 l H₂O_{reinst}
- 10 x TBS
 - 60,55 g Tris (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 85,2 g NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - ad 1 l H₂O_{reinst}, pH 7,6 mit HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 1 x TBS-T
 - 500 ml 10 x TBS
 - 5 ml Tween 20 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - ad 5 l H₂O_{reinst}

DURCHFÜHRUNG

Der „*Wet-Blot*“ schließt sich unmittelbar an die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese an. Zunächst wird die PVDF -Membran mit 10 ml Methanol befeuchtet und anschließend in 40 ml Transferpuffer 5 min schüttelnd inkubiert. Das SDS-Polyacrylamidgel wird aus der Apparatur entnommen, das Sammelgel wird entfernt und verworfen. Das Trenngel sowie Filterpapiere und Schwämme werden mit Transferpuffer benetzt. Der Transferpuffer zeichnet sich durch einen 20 %-igen Methanolgehalt aus, der eine bessere Bindung von Proteinen an die PVDF-Membranen gewährleistet (Bade *et al.*, 2012). Zum Blotten werden Gel und Membran wie folgt für die Blottingapparatur geschichtet: ein Schwamm, drei Filterpapiere, PVDF-Membran, Trenngel mit aufgetrennten Proteinen, drei Filterpapiere, ein Schwamm. Zum Ausschluss von Luftblasen wird mit einem Reagenzglas ausgestrichen und das Trenngel in der beschriebenen Schichtung mit der Membran in die Blottingapparatur eingespannt. In die Blottingapparatur wird ein dafür

vorgesehenes, vorgekühltes (-20 °C) Kühlaggregat gegeben und die gesamte Apparatur in einen eisgekühlten Behälter gestellt, um übermäßige Wärmebildung zu verhindern. Die Blottingapparatur wird mit Transferpuffer aufgefüllt. Das Blotting erfolgt bei konstant 350 mA für 1 h 15 min.

Anschließend erfolgt die Blockierung der Membran für eine Stunde in 5 % Milchpulverlösung in TBS-T. Dies dient dem Abdecken von unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran (Eslami & Lujan, 2010).

B.7.5 Detektion mithilfe von Antikörpern

Im Anschluss an den „*Wet-Blot*“ werden die an die Membran gebundenen Proteine mittels spezifischer Antikörper detektiert. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primärantikörper sind in Tabelle 7 aufgeführt. Als Ladekontrolle wurde in den durchgeführten Versuchen Hsp90 (*heat shock protein 90*) detektiert, welches in verschiedenen Zellen unabhängig von Kulturbedingungen wie etwa der Zelldichte in gleichem Maße exprimiert wird (Greer *et al.*, 2010). Die Detektion der Antikörperbindung erfolgt mit einem chemilumineszentem Sekundärantikörper, der den verwendeten Primärantikörper speziesspezifisch bindet (verwendete Sekundärantikörper siehe Tabelle 8).

MATERIAL

- Chemi-Smart 5100 (Detektionsgerät) (Peylab, Erlangen, Deutschland)
- ChemiCapt Software (Peylab, Erlangen, Deutschland)
- Luminol-Stocklösung für Herstellung S1
 - 5 ml 1 M Hepes (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 7,4
 - 3 ml 5 M NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 1 ml 100 % Triton X-100 (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 0,2 ml 0,5 M EDTA (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 8,0
 - 10 ml 100 % Glycerin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - ad 100 ml H₂O_{reinst}
 - frisch hinzugeben zu 1 ml:
 - 2 µl 0,25 M PMSF (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
 - 4 µl 0,25 M DTT (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
 - 10 µl 10 x Protease-Inhibitor (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Roti®-Lumin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

- Primärantikörper vgl. Tabelle 7
- Schüttler Polymax 1040 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
- Sekundärantikörper vgl. Tabelle 8
- 1 x TBST siehe B.7.4
- S1-Lösung:
 - 80 ml H₂O_{reinst}
 - 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5
 - 1 ml Luminol Stocklösung
 - 0,44 ml Stabilisatorlösung
 - ad 100 ml H₂O_{reinst}
- S2-Lösung
 - 80 ml H₂O_{reinst}
 - 10 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,5
 - 60 µl 30 % H₂O₂
 - ad 100 ml H₂O_{reinst}

Gebrauchslösung: 1:1 S1-Lösung : S2-Lösung
- Stabilisatorlösung für S1-Lösung
 - 2 ml 1 M Tris/HCl, pH 8,0
 - 2,92 g NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - 0,5 ml 1 M Imidazol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
 - ad 100 ml 8 M Urea (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), pH 7,9
- SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)

Tabelle 7. Verwendete Primärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Detektion
Anti-EGFR total, 175 kDa (mouse)	1:250 in TBS-T	BD Transduction Laboratories Heidelberg, Deutschland	S1/S2
Anti-pEGFR Y1173, 175 kDa (rabbit)	1:1000 in TBS-T	Cell Signaling, Danvers, USA	Femto
Anti-ERK total, 40 kDa (rabbit)	1:10000 in TBS-T	Cell Signaling, Danvers, USA	S1/S2
Anti-pERK, 42/44 kDa (rabbit)	1:1000 in TBS-T	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	S1/S2
Anti-FLAG M2 (mouse)	1:500 in TBS-T	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	S1/ S2
Anti-Hsp90, 90 kDa (mouse)	1:10000 in TBS-T	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	Rotilumin
Anti-MKL1, 140 kDa (rabbit)	1:500 in TBS-T	Mühlich et al, 2008	S1/S2
Anti-Myoferlin, 230 kDa (mouse)	1:500 in TBS-T	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	S1/S2

Tabelle 8. Verwendete Sekundärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	1:10000 in TBS-T	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	1:10000 in TBS-T	Cell Signaling Technology, Frankfurt, Deutschland

DURCHFÜHRUNG

Die bereits geblockte Membran (vgl. B.7.4) wird im Anschluss an den Blockierungsschritt dreimal 5 min mit TBS-T auf dem Schüttler inkubiert. Die eingesetzten Primärantikörper werden in TBS-T-Lösung verdünnt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgt über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wird die Membran dreimal 15 min in TBS-T auf dem Schüttler gewaschen. Anschließend erfolgt die 60-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (je nach Primärantikörper anti-mouse oder anti-rabbit). Anschließend wird die Membran dreimal mit TBS-T für 5 min schüttelnd inkubiert, danach einmal für 5 min in TBS inkubiert. Nun erfolgt die Detektion am *Chemi-Smart 5100* Detektionsgerät.

Je nach Antikörper werden unterschiedliche Detektionslösungen verwendet, um ein optimales Detektionsergebnis zu erhalten. Für die Detektion von Hsp90 werden 1 ml Roti®Lumin 1 und 1 ml Roti®Lumin 2-Lösung vermengt und für eine Minute inkubiert. Bei Verwendung von S1-Lösung und S2-Lösung wird ebenfalls jeweils 1 ml der

entsprechenden Lösungen vermenget und 1 min inkubiert. Die Detektion mit *SuperSignal™ West Femto Chemiluminescent Substrate* erfolgt nach den Herstellerangaben. Es wurden die im Kit enthaltenen Lösungen im Verhältnis 1:1 zusammengemischt, auf die Membran gegeben und 5 min inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation mit der entsprechenden Detektionslösung erfolgt die Detektion der Chemilumineszenz am Chemismart 5100 Detektionsgerät und das Abfotographieren des entstandenen Bildes.

B.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden mithilfe des Programms „*Prism*“ der Firma Graph Pad, La Jolla, USA, statistisch ausgewertet. Die zugehörigen Graphen wurden ebenfalls mit dem Programm „*Prism*“ erstellt. Zunächst wurde überprüft, ob die gemessenen Werte einer Normalverteilung folgen. Bei Vorliegen einer Normalverteilung ist die Durchführung eines t-Test sinnvoll (Ghasemi & Zahediasl, 2012). Die Validität von parametrischen Tests, wie t-Tests, beruht auf dem Vorliegen einer Normalverteilung (Ghasemi & Zahediasl, 2012). Es wurden in der vorliegenden Arbeit ungepaarte, zweiseitige t-Tests zum Signifikanzniveau $p < 0,05$ durchgeführt. Als Test auf Normalverteilung wurde zunächst ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt, bei dem ein Wert W , der nahe 1 liegt, auf Normalverteilung hindeutet (Henderson, 2006). Allerdings wird für die Durchführung dieses Tests eine genügend große Stichprobenanzahl benötigt. War diese Voraussetzung nicht gegeben, wurden QQ-Plots durchgeführt, aus diesen lassen sich ebenfalls Hinweise ableiten, ob eine Normalverteilung vorliegt (Henderson, 2006). Wenn keine Normalverteilung der Daten vorliegt, ist ein Mann-Whitney-Test sinnvoll (Hart, 2001), der in der vorliegenden Arbeit ebenfalls mit dem Programm „*Prism*“ durchgeführt wurde.

C. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden an der Tumorigenese hepatozellulärer Karzinomzelllinien beteiligte Mechanismen näher untersucht. Als Zellkultursystem wurden sowohl DLC1-defiziente HuH7-Zellen eingesetzt als auch HepG2-Zellen, die den Tumorsuppressor DLC1 exprimieren (Mühlich *et al.*, 2012). Zunächst wurden mithilfe dieser Zelllinien die Effekte des Tumorsuppressors DLC1 und einer Depletion von MKL1/2 auf das autonome Wachstumsverhalten auf Weichagar sowie das Zellzyklusverhalten untersucht.

Bei in Vorarbeiten durchgeführten Mikroarray-Analysen konnte Myoferlin als potentielles MKL1/2-abhängiges Zielgen identifiziert werden. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher Myoferlin als MKL1/2-abhängiges Zielgen näher charakterisiert. Zunächst wurde das autonome Wachstumsverhalten mittels Weichagar sowie die Zellzyklusverteilung nach Myoferlin-Depletion analysiert. Um zu untersuchen, ob eine Myoferlin-Depletion mit Induktion von Seneszenz einhergeht, wurde die β -Galactosidase-Aktivität Myoferlin-defizienter Zellen bestimmt. Im Anschluss daran wurden Komponenten verschiedener zellulärer Signalwege in Myoferlin-depletierten Zellen untersucht.

C.1 CHARAKTERISIERUNG DES WACHSTUMSVERHALTENS IN ABHÄNGIGKEIT VON MKL1/2 UND DLC1

C.1.1 Autonomes Wachstumsverhalten auf Weichagar

Der „*Anchorage Independent Colony Assay*“ oder „*Soft Agar Assay*“ bzw. Weichagartest dient dazu, zu untersuchen, ob bei Zelllinien Hinweise auf maligne Transformation vorliegen (Borowicz *et al.*, 2014). Maligne entartete Zellen können im Gegensatz zu nicht-transformierten Zellen ohne Adhäsion an ein Zellkulturgefäß proliferieren (Cifone, 1982). Dadurch können maligne entartete Zellen Kolonien in Weichagar bilden, obwohl hier eine Anheftung an das Zellkulturgefäß fehlt. Dieses Wachstum auf Weichagar stellt ein Korrelat der Tumorigenität dar (Cifone, 1982).

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden Weichagartests in der Arbeitsgruppe eingeführt. Für Weichagartests wurden pro Versuchsreihe 10 Petrischalen mit 20.000 Zellen pro Schale und weitere 10 Petrischalen mit jeweils 40.000 Zellen angesetzt. Nach 21 Tagen Inkubationszeit wurde die Koloniebildung ausgewertet.

Im Folgenden wurde zunächst das Wachstumsverhalten auf Weichagar in DLC1-exprimierenden HepG2-Zellen in Abhängigkeit vom Tumorsuppressor DLC1 analysiert. Dies diente dazu, die Effekte des Tumorsuppressors DLC1 zu untersuchen. In der gleichen Zelllinie wurden zudem die Effekte einer Depletion der transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2 auf das autonome Wachstumsverhalten analysiert.

C.1.1.1 Autonomes Wachstumsverhalten von HepG2-Zellen in Abhängigkeit von DLC1

Um die Abhängigkeit des autonomen Zellwachstums der Zelllinie HepG2 vom Tumorsuppressor DLC1 zu evaluieren, wurden Weichagartests mit DLC1 shRNA-exprimierenden HepG2-Zellen, bei denen mittels RNA-Interferenz der Tumorsuppressor DLC1 ausgeschaltet ist (Hampl *et al.*, 2013), durchgeführt. Als Vergleich dienten unbehandelte HepG2-Kontrollzellen. Die DLC1-depletierten HepG2-Zellen (HepG2-Knockdown-Zellen, HepG2-DLC1-KD) wurden von Dr. Scott Lowe freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Mühlich *et al.*, 2012).

HepG2-Zellen, bei denen der Tumorsuppressor DLC1 mittels RNA-Interferenz ausgeschaltet ist, zeigten ein signifikant erhöhtes Wachstum auf Weichagar im Vergleich zu HepG2-Kontrollzellen. Als Test auf Normalverteilung der untersuchten Proben wurde ein Shapiro-Wilk-Test durchgeführt. Hier zeigte sich, dass nicht alle Stichproben normalverteilt sind (vgl. W-Werte Tabelle 9). Daher wurde zur statistischen Analyse ein Mann-Whitney-Test durchgeführt. Die Koloniebildung war in DLC1-defizienten HepG2-Zellen im Vergleich zu HepG2-Kontrollzellen statistisch signifikant erhöht ($p=0,0003^{***}$ bei Inokulation von 20.000 Zellen, vgl. Abbildung 2; $p=0,0002^{***}$ bei 40.000 ausgesäten Zellen, vgl. Abbildung 3). Tabelle 9 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Koloniebildung aller ausgezählten Petrischalen. In Abbildung 2 und Abbildung 3 ist die Koloniebildung auf Weichagar exemplarisch aufgeführt und die statistische Auswertung graphisch dargestellt.

Tabelle 9. Koloniebildung in HepG2-Kontrollzellen im Vergleich zu HepG2-DLC1-Knockdown-Zellen.

Angegeben sind Mittelwert/Standardabweichung (*SD*) und erhaltener Wert im Shapiro-Wilk-Test (*W*). Stichprobenumfang (*n*) bei 2×10^4 ausgesäten Zellen: HepG2 *n*=8, HepG2-DLC1-KD *n*=7; Bei 4×10^4 ausgesäten Zellen: HepG2 *n*=9, HepG2-DLC1-KD *n*=6 (hier Shapiro-Wilk-Test wegen geringem Stichprobenumfang nicht möglich).

Zelllinie	Kolonien pro 20.000 ausgesäter Zellen	Kolonien pro 40.000 ausgesäter Zellen
HepG2	0,63, <i>SD</i> 1,1 <i>W</i> =0,6756	3,6, <i>SD</i> 6,4 <i>W</i> =0,6170
HepG2-DLC1-KD	141, <i>SD</i> 111 <i>W</i> =0,9021	410, <i>SD</i> 40,1

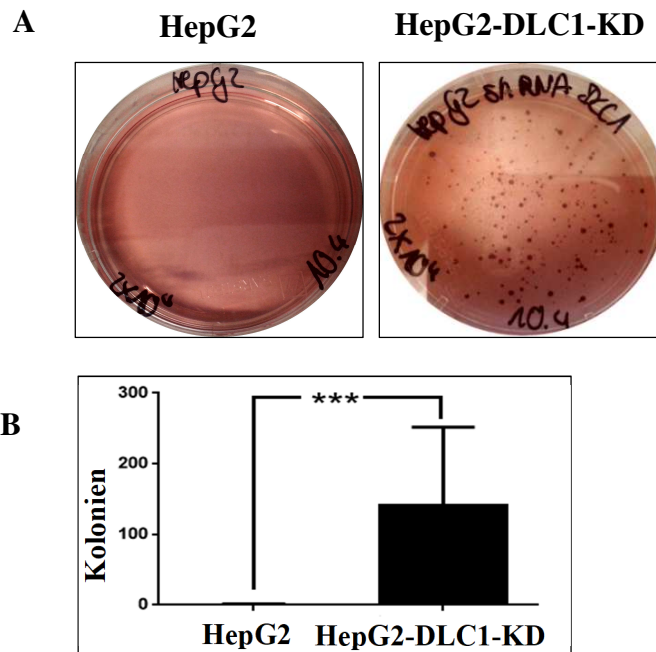


Abbildung 2. Koloniebildung DLC1-depletierter HepG2-Zellen auf Weichagar im Vergleich zu HepG2-Kontrollzellen (20.000 ausgesäte Zellen).

A: Koloniebildung HepG2-Zellen (die Abbildung ist repräsentativ für 8 Petrischalen) im Vergleich zur Koloniebildung bei HepG2-DLC1-Knockdown-Zellen (die Abbildung ist repräsentativ für 7 Petrischalen).

B: HepG2-Zellen, in denen DLC-1 ausgeschaltet ist, zeigen eine statistisch signifikant erhöhte Koloniebildung auf Weichagar, $p=0,0003***$.

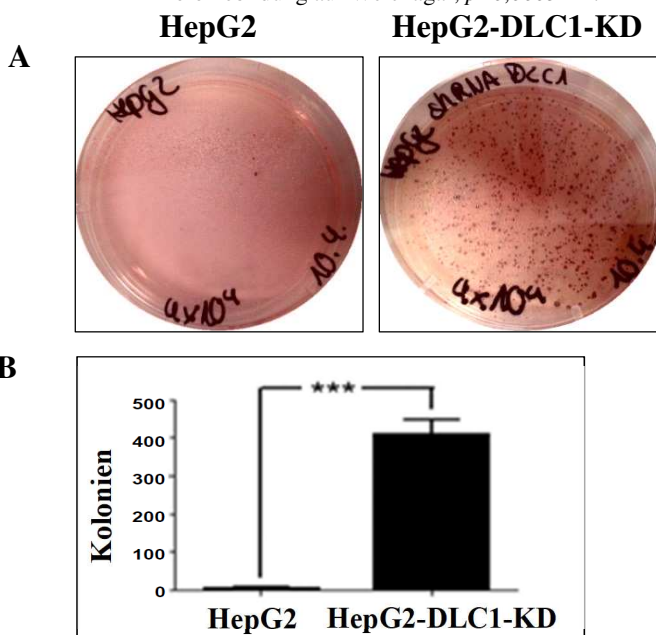


Abbildung 3. Koloniebildung DLC1-depletierter HepG2-Zellen auf Weichagar im Vergleich zu HepG2-Kontrollzellen (40.000 ausgesäte Zellen).

A: Koloniebildung in HepG2-Zellen (die Abbildung ist repräsentativ für 9 Petrischalen) im Vergleich zur Koloniebildung bei HepG2-DLC1-Knockdown-Zellen (die Abbildung ist repräsentativ für 6 Petrischalen).

B: HepG2-Zellen, in denen DLC1 ausgeschaltet ist, zeigen eine statistisch signifikant erhöhte Koloniebildung auf Weichagar, $p=0,0002***$.

C.1.1.2 Autonomes Wachstumsverhalten von HepG2- Zellen in Abhängigkeit von MKL1/2

Um das autonome Wachstumsverhalten der Zelllinie HepG2 in Abhängigkeit von der MKL1/2-Expression zu untersuchen, wurden HepG2-Zellen mit HepG2-shRNA-MKL1/2 exprimierenden Zellen verglichen. In diesen Zellen ist MKL1/2 mittels RNA-Interferenz ausgeschaltet. Die hier verwendeten HepG2-MKL1/2-depletierten Zellen (Hep G2-MKL1/2-KD) wurde von Frau Dr. Veronika Hampl hergestellt sowie auf ausreichende Knockdown-Effizienz getestet (Hampl *et al.*, 2013) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Bei HepG2-Kontrollzellen konnte kein Unterschied in der Koloniebildung im Vergleich zu MKL1/2-defizienten HepG2-Zellen festgestellt werden. Es zeigte sich nach MKL1/2-Knockdown keine verstärkte Koloniebildung auf Weichagar bei jeweils 10 Petrischalen à 20.000 bzw. 40.000 Zellen (vgl. Tabelle 10, Abbildung 4).

Tabelle 10. Koloniebildung in HepG2-Kontrollzellen im Vergleich zu HepG2-Zellen mit MKL1/2-Knockdown.

Zelllinie	Kolonien pro 20.000 ausgesäter Zellen	Kolonien pro 40.000 ausgesäter Zellen
HepG2	<1	<1
HepG2-MKL1/2-KD	<1	<1

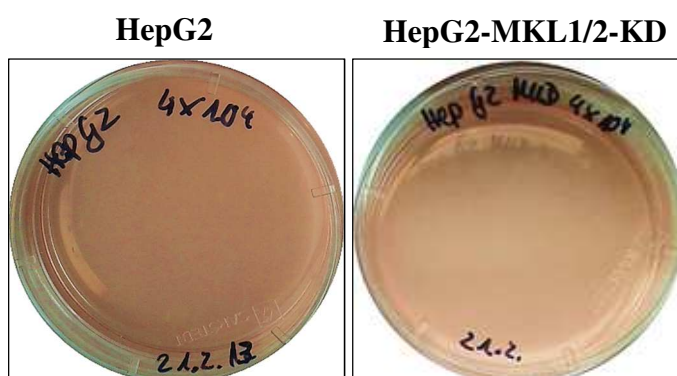


Abbildung 4. Koloniebildung in HepG2-Zellen in Abhängigkeit von MKL1/2 auf Weichagar.

Exemplarisch ist die Koloniebildung bei 40.000 ausgesäten Zellen aufgeführt. Links ist die Koloniebildung auf Weichagar der Zelllinie HepG2 dargestellt, rechts die Koloniebildung von MKL1/2-depletierten HepG2-Zellen. Jedes Bild ist repräsentativ für 10 Ansätze nach 21 Tagen Inkubation.

C.1.2 Effekte von DLC1 und MKL1/2 auf die Zellzyklusprogression

Um zu analysieren, in welcher Form DLC1 und MKL1/2 Einfluss auf die Progression des Zellzyklus nehmen, wurde die Zellzyklusverteilung der untersuchten hepatozellulären Karzinomzelllinien mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei wurde insbesondere der prozentuale Anteil an Zellen in der G1-Phase ermittelt. Eine Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase ist ein typisches Kennzeichen von Zellen, die in die Seneszenz eingetreten sind (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden Zellzyklusanalysen in der Arbeitsgruppe eingeführt. Die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse nach Propidiumiodidfärbung auf die Distribution in den einzelnen Zellzyklusphasen hin analysiert. Aufgrund der geringen Stichprobengröße bei den analysierten Proben war die Durchführung eines Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung nicht möglich. Laut Hüsler und Zimmermann (2006) ist zur Überprüfung der Normalverteilung die Anwendung eines sog. QQ-Plots möglich. Um Anhaltspunkte für das Vorliegen einer Normalverteilung zu erhalten, wurden daher QQ-Plots erstellt. Bei Hinweisen auf Normalverteilung wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test durchgeführt.

C.1.2.1 Zellzyklusverteilung in Abhängigkeit von DLC1 in HepG2-Zellen

Um die Abhängigkeit der Zellzyklusprogression in HepG2-Zellen vom Tumorsuppressor DLC1 zu untersuchen, wurden in den folgenden Experimenten HepG2-Zellen mit DLC1-depletierten HepG2-Zellen verglichen. In diesen Zellen ist der Tumorsuppressor DLC1 mittels RNA-Interferenz depletiert (HepG2-DLC1-Knockdown (KD)) (Hampl *et al.*, 2013). Als Kontrollzelllinie dienten HepG2-Zellen, die den shRNA-Leervektor stabil transfiziert enthielten (HepG2 MCL-Zellen). Die HepG2-shRNA-DLC1-exprimierenden Zellen wurden von Dr. Scott Lowe freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Mühlich *et al.*, 2012).

Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, die prozentuale Verteilung auf die einzelnen Zellzyklusphasen zeigt Tabelle 11. Abbildung 5 gibt einen Überblick über den prozen-

tualen Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Durch Depletion des Tumorsuppressors DLC1 zeigte sich kein geändertes Zellzyklusverhalten in den untersuchten Zelllinien. Es konnte keine Arretierung in der G1-Phase in DLC1-depletierten HepG2-Zellen im Vergleich zu HepG2-Kontrollzellen beobachtet werden (vgl. Abbildung 5). Bei Durchführung eines t-Tests ergab sich keine statistische Signifikanz ($p=0,2659$; Signifikanzniveau $p<0,05$). Im Anhang sind die QQ-Plots der ausgewerteten prozentualen Anteile an Zellen in der G1-Phase aufgeführt (HepG2-Kontrollzellen vgl. Abbildung 24, HepG2-DLC1-KD-Zellen vgl. Abbildung 25).

Tabelle 11. Prozentualer Anteil an Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bei HepG2-Zellen in Abhängigkeit von DLC1.

Die aufgeführten Werte entsprechen Mittelwerten aus 3 Messungen mit Standardabweichung (SD).

Zelllinie	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
HepG2 Leervektor	31,3 % SD 7,2	44,6 % SD 12,3	22,7 % SD 4,7
HepG2-DLC1-KD	38,1 % SD 1,15	40,3 % SD 3,7	20,2 % SD 3

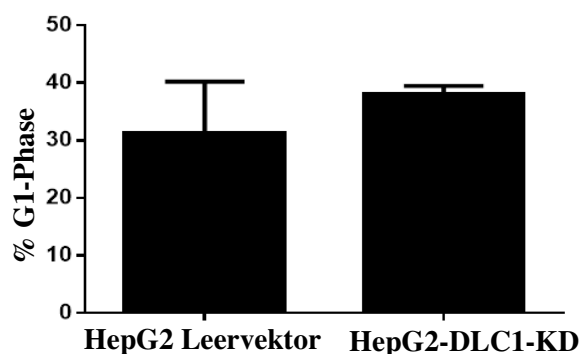


Abbildung 5. Prozentualer Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus bei HepG2-Zellen in Abhängigkeit von DLC1.

Nach Depletion von DLC1 in HepG2-Zellen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Zellzyklusverteilung in der G1-Phase.

C.1.2.2 Zellzyklusverteilung in Abhängigkeit von MKL1/2 in HepG2-Zellen

Im Folgenden wurde die Zellzyklusverteilung von HepG2-Kontrollzellen mit MKL1/2-depletierten HepG2-Zellen verglichen, um die Effekte der transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2 auf die Zellzyklusprogression zu untersuchen. Die untersuchten HepG2 MKL1/2-Knockdownzellen (HepG2-MKL1/2-KD) wurden von Frau Dr. Veronika

Hamp1 durch RNA-Interferenz hergestellt sowie auf geeignete Effizienz des Knock-downs überprüft (Hampl *et al.*, 2013).

Von jeder Probe wurden jeweils Dreifach- bzw. Vierfachwerte gemessen. Von den so erhaltenen Werten wurden Mittelwerte gebildet. In tabellarischer Form angegeben ist die prozentuale Verteilung auf die einzelnen Zellzyklusphasen (Mittelwert plus Standardabweichung, vgl. Tabelle 12). Abbildung 6 gibt die prozentuale Verteilung an Zellen in der G1-Phase im Vergleich von unbehandelten HepG2-Zellen und MKL1/2-depletierten HepG2-Zellen wieder.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der G1-Phase zwischen HepG2-Kontrollzellen und HepG2-MKL1/2-depletierten Zellen ($p=0,4917$ bei Anwendung eines t-Tests, Signifikanzniveau $p<0,05$, QQ-Plots vgl. Abbildung 26 und Abbildung 27 im Anhang).

Tabelle 12. Prozentualer Anteil an Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bei HepG2-Zellen in Abhängigkeit von MKL1/2

Die aufgeführten Werte entsprechen Mittelwerten aus 3 Messungen mit Standardabweichung (SD).

Zelllinie	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
HepG2	33,85 % SD 4,2	33,85 % SD 8,1	33,64 % SD 12,7
HepG2-MKL1/2-KD	36,2 % SD 1,0	43,6 % SD 4,8	20,15 % SD 2,2

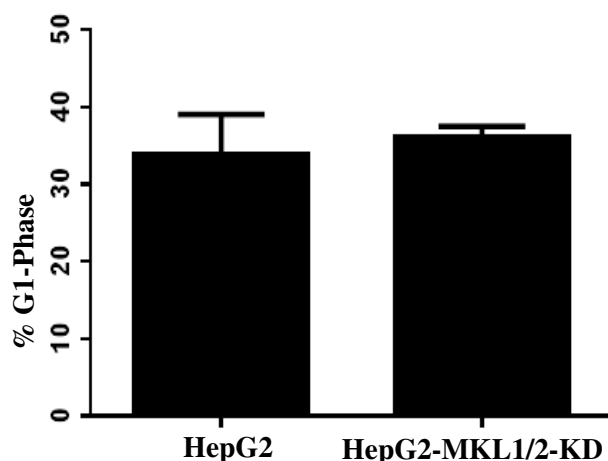


Abbildung 6. Prozentualer Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus bei HepG2-Zellen in Abhängigkeit von MKL1/2.

Nach Depletion von DLC1 in HepG2-Zellen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der Zellzyklusverteilung in der G1-Phase.

C.1.2.3 Zellzyklusverteilung nach MKL1/2-Depletion in DLC1-defizienten HuH7-Zellen

Um Effekte eines Knockdowns von MKL1/2 auf die Zellzyklusprogression in DLC1-defizienten Zellen zu untersuchen, wurden im Folgenden HuH7-Zellen analysiert. HuH7-Zellen sind durch die fehlende Expression des Tumorsuppressors DLC1 gekennzeichnet (Mühlich *et al.*, 2012). In den hier aufgeführten Experimenten wurden HuH7-Kontrollzellen mit HuH7 MKL1/2-Knockdown-Zellen mittels durchflusszytometrischer Analysen verglichen. Die für die durchflusszytometrischen Analysen verwendeten HuH7 MKL1/2-Knockdown-Zelllinien (HuH7-MKL1/2-KD) wurden von Frau Dr. Veronika Hampl hergestellt sowie auf die Effizienz des Knockdowns untersucht (Hampl *et al.*, 2013).

Im Folgenden ist in tabellarischer Form der prozentuale Anteil an Zellen in der jeweiligen Zellzyklusphase angegeben (vgl. Tabelle 13). Abbildung 7 zeigt den prozentualen Anteil der untersuchten Zelllinien in der G1-Phase des Zellzyklus. Es konnte nach MKL1/2-Depletion ein erhöhter Anteil von Zellen in der G1-Phase festgestellt werden. Bei Anwendung eines ungepaarten, zweiseitigen t-Tests ist der gemessene Unterschied statistisch signifikant ($p=0,0113^*$, Signifikanzniveau $p<0,05$). Die QQ-Plots der ausgewerteten Daten sind im Anhang aufgeführt (vgl. Abbildung 28, Abbildung 29).

Tabelle 13. Prozentualer Anteil an Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen bei HuH7-Zellen in Abhängigkeit von MKL1/2.

Es wurden zwei Experimente mit HuH7 unbehandelten Kontrollzellen und drei Experimente mit MKL1/2-depletierten Zellen durchgeführt. Von den Ergebnissen wurden jeweils Mittelwerte mit Standardabweichung (SD) berechnet.

Zelllinie	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
HuH7	35,92 % SD 2,38	38,06 % SD 5,1	16,6 % SD 2,1
HuH7-MKL1/2-KD	46,6 % SD 0,8	28,2 % SD 8,3	20,4 % SD 1,7

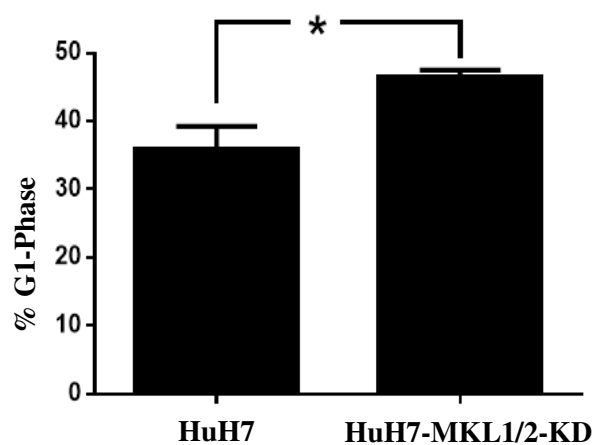


Abbildung 7. Prozentualer Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus nach Depletion von MKL1/2 in HuH7-Zellen.

Nach Depletion von MKL1/2 in HuH7-Zellen zeigt sich ein leicht erhöhter prozentualer Anteil an Zellen in der G1-Phase.

C.2 CHARAKTERISIERUNG DES WACHSTUMSVERHALTENS IN ABHÄNGIGKEIT VON MYOFERLIN

Bei in Vorarbeiten durchgeführten Mikroarray-Analysen wurde Myoferlin als ein MKL1/2- abhängiges Zielgen identifiziert (Hermanns *et al.*, 2017). Um zu untersuchen, ob Myoferlin in Zusammenhang mit dem MKL1/2-abhängigen Proliferationsstopp in DLC1-defizienten hepatozellulären Karzinomzellen (Hampl *et al.*, 2013) steht, wurden Myoferlin-depletierte HuH7 Zellen mittels lentiviraler Transduktion hergestellt. Diese Myoferlin-depletierten Zellen exprimieren eine Myoferlin-spezifische shRNA-Sequenz, welche die Myoferlin-Expression mittels RNA-Interferenz unterdrückt (Moore *et al.*, 2010).

Zunächst wurde das Wachstumsverhalten Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen näher analysiert. Im Folgenden wurde zuerst das autonome Wachstumsverhalten Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen auf Weichagar untersucht. Anschließend wurde das Zellzyklusverhalten mittels durchflusszytometrischer Analysen ermittelt. Des Weiteren wurde die β -Galactosidase-Aktivität bestimmt, um zu analysieren, ob durch Ausschalten von Myoferlin HuH7-Zellen in die Seneszenz eintreten analog der beobachteten Seneszenzinduktion nach Depletion von MKL1/2 in HuH7-Zellen (Hampl *et al.*, 2013).

C.2.1 Autonomes Wachstumsverhalten von HuH7-Zellen in Abhängigkeit von Myoferlin

Um den Effekt einer Myoferlin-Depletion auf das autonome Zellwachstum von HuH7-Zellen zu untersuchen, wurden durch lentivirale Transduktion und RNA-Interferenz mittels shRNA Myoferlin-depletierte HuH7-Zellen hergestellt (HuH7-Myoferlin-KD). Um die Auswirkungen der eingesetzten lentiviralen Transduktion auf das autonome Wachstumsverhalten der hepatozellulären Karzinomzelllinie HuH7 zu evaluieren, wurden in gleicher Weise HuH7-Zellen mit Leervektor-shRNA-Transduktion hergestellt. Die Koloniebildung wurde 3 Wochen nach dem Aussäen der Zellen auf Weichagar beurteilt.

In einem ersten Versuchsansatz wurden HuH7-Zellen, HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion und Myoferlin-shRNA-exprimierende Zellen (HuH7-Myoferlin-KD) in jeweils 10 Ansätzen à 20.000 Zellen verglichen. Es stellte sich eine Verminderung der

Koloniebildung auf Weichagar von HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion im Gegensatz zu HuH7 unbehandelten Kontrollzellen heraus. Die autonome Koloniebildung Myoferlin-depletierter Zellen war im Vergleich zu Zellen mit Leervektor-Transduktion sowie im Vergleich zu HuH7-Kontrollzellen im Mann-Whitney-Test statistisch signifikant verringert (Myoferlin-depletierte Zellen im Vergleich zu HuH7-Kontrollzellen: $p < 0,0001^{****}$, Myoferlin-KD im Vergleich zu HuH7-Leervektor $p = 0,0108^*$; vgl. Abbildung 9, Abbildung 8 A). Der Mann-Whitney-Test wurde gewählt, da bei einigen Proben nach Shapiro-Wilk-Test keine Normalverteilung vorlag (bei HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion: $W = 0,7837$ bei $n = 10$). Abbildung 8 B zeigt die Myoferlin-Knockdown-Effizienz der Myoferlin-depletierten Zellen. Tabelle 14 gibt die Mittelwerte der ausgezählten Kolonien pro 20.000 ausgesäter Zellen wieder.

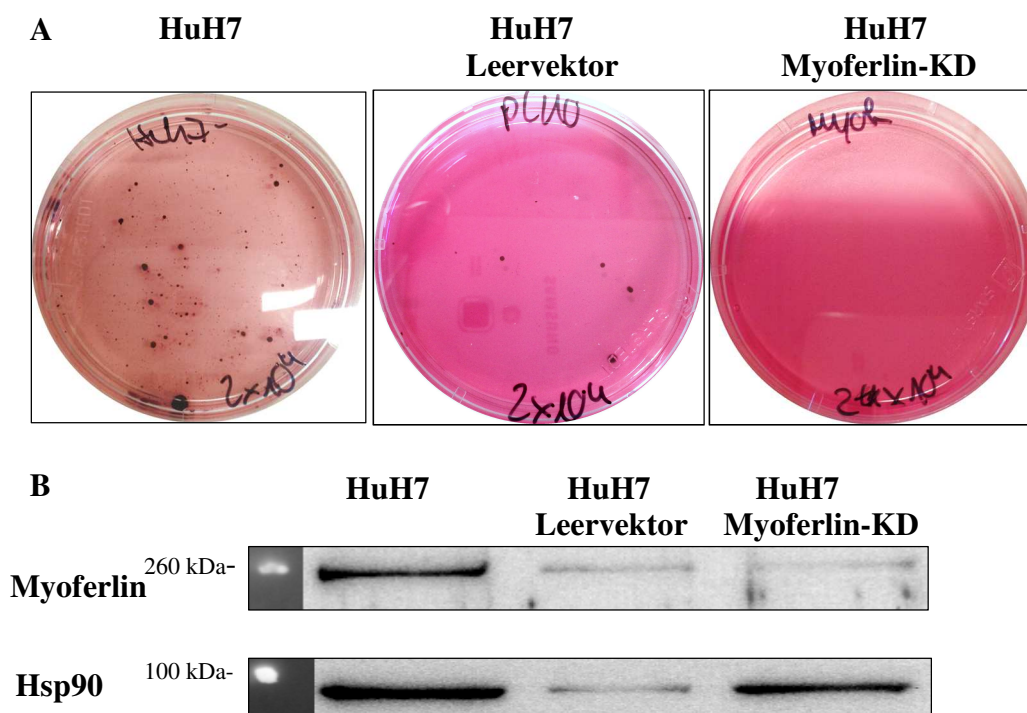


Abbildung 8. Koloniebildung Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen auf Weichagar im Vergleich zu HuH7-Kontrollzelllinien.

A: Vergleich der Koloniebildung bei jeweils 20.000 ausgesäten HuH7-Kontrollzellen, HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion und Myoferlin-depletierte Zellen (HuH7-Myoferlin-KD)
 B: Myoferlin-Expression der eingesetzten Zelllinien.

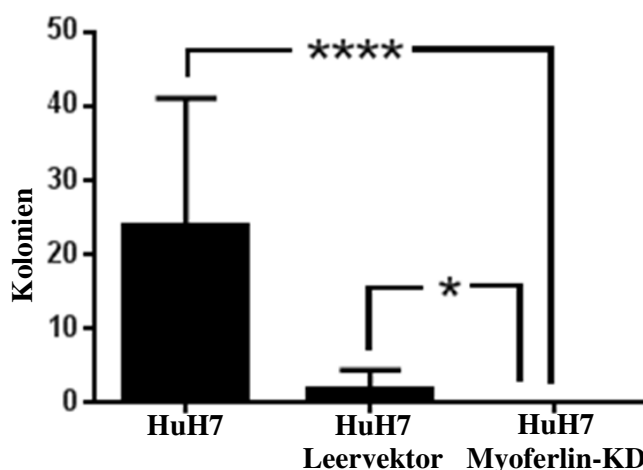


Abbildung 9. Übersicht Koloniebildung Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen auf Weichagar im Vergleich zu Kontrollzelllinien.

Die Koloniebildung auf Weichagar wurde bei 20.000 ausgesäten Zellen untersucht. Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen zeigten eine statistisch signifikante Verminderung der Koloniebildung auf Weichagar im Vergleich zu HuH7-Kontrollzelllinien. Mann-Whitney-Test: Vergleich HuH7-Kontrollzellen zu HuH7-Myoferlin-KD: $p < 0,0001$ ****, HuH7-Leervektor zu Myoferlin-KD: $p = 0,0108$ *.

Tabelle 14. Koloniebildung auf Weichagar Myoferlin-depletierter Zellen im Vergleich zu HuH7-Kontrollzellen und HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion (20.000 ausgesäte Zellen).

Angegeben sind Stichprobenumfang, Mittelwert und Standardabweichung.

Zelllinie	Kolonien pro 20.000 ausgesäte Zellen
HuH7 ($n=9$)	24, SD 17
HuH7-Leervektor ($n=10$)	1,9, SD 2,6
HuH7-Myoferlin-KD ($n=10$)	0

Um die Effekte der Myoferlin-Depletion im Vergleich zur Leervektor-Transduktion genauer zu untersuchen, wurden in einem weiteren Versuchsansatz Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen in jeweils 10 Ansätzen à 20.000 Zellen und in 10 Ansätzen à 40.000 Zellen ausgesät. In gleicher Weise wurden HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion ausgesät. Abbildung 12 zeigt die Myoferlin-Expression der eingesetzten Zelllinien.

Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen jeweils exemplarisch die Koloniebildung auf Weichagar und die graphische Auswertung der Koloniebildung der einzelnen Zelllinien. Tabelle 15 gibt die Mittelwerte der Koloniebildung der untersuchten Zelllinien wieder. Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen zeigten eine im Gegensatz zu HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion verminderte Fähigkeit zu Koloniebildung auf Weichagar. In

allen Versuchsansätzen war die Koloniebildung Myoferlin-depletierter Zellen statistisch signifikant vermindert im Vergleich zu HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion.

Bei der Versuchsreihe mit 20.000 ausgesäten Zellen konnte aufgrund der geringen Stichprobengröße nach Myoferlin-Depletion kein Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung durchgeführt werden, im QQ-Plot zeigte sich keine eindeutige Normalverteilung (QQ-Plot HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion vgl. Abbildung 30; Myoferlin-depletierte Zellen vgl. Abbildung 31 im Anhang; Stichprobenumfang: HuH7-Leervektor: $n=9$, $W=0,8905$, HuH7-Myoferlin-KD: $n=5$). Bei Durchführung des Mann-Whitney-Tests zeigte sich eine statistisch signifikante Verminderung der Koloniebildung Myoferlin-depletierter Zellen auf Weichagar ($p=0,0005***$).

Bei der Versuchsreihe mit 40.000 ausgesäten Zellen zeigten sich bei Durchführung eines Shapiro-Wilk-Tests Hinweise darauf, dass eine Normalverteilung vorliegt. (Shapiro-Wilk-Test für HuH7-Leervektor: $W=0,9073$ bei $n=7$, HuH7-Myoferlin-KD: $W=0,9240$ bei $n=10$, QQ-Plot vgl. Abbildung 32 und Abbildung 33 im Anhang). Im daraufhin durchgeführten ungepaarten, zweiseitigen t-Test zeigte sich eine statistisch signifikante Verminderung ($p=0,0001***$) der Koloniebildung Myoferlin-depletierter Zellen im Vergleich zu HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion (Signifikanzniveau $p<0,05$).

Tabelle 15. Koloniebildung Myoferlin-depletierter Zellen auf Weichagar im Vergleich zu HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion.

Angegeben sind jeweils die Mittelwerte der Koloniebildung und Standardabweichung (*SD*).

Zelllinie	Kolonien pro 20.000 ausgesäte Zellen	Kolonien pro 40.000 ausgesäte Zellen
HuH7-Leervektor	34, <i>SD</i> 23,5	135, <i>SD</i> 80
HuH7-Myoferlin-KD	3, <i>SD</i> 2	4, <i>SD</i> 2

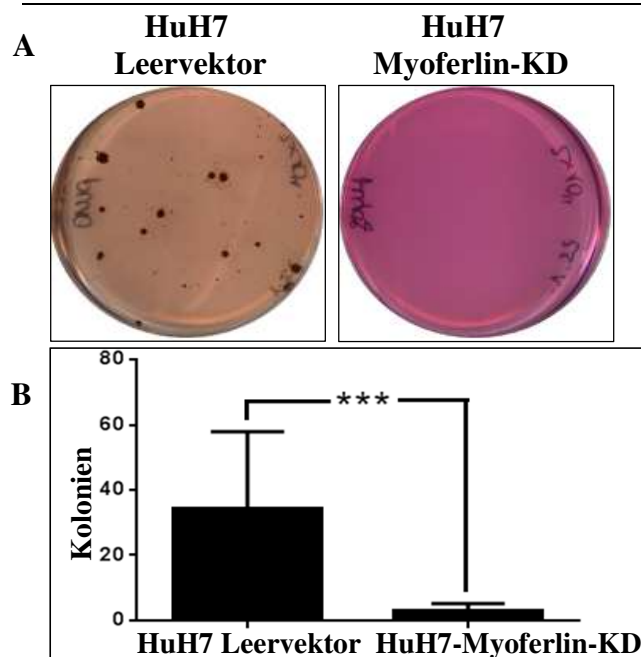


Abbildung 10. Verminderte Koloniebildung Myoferlin-depletierter Zellen auf Weichagar (20.000 ausgesäte Zellen).

A: Koloniebildung nach Knockdown von Myoferlin in HuH7-Zellen im Vergleich zu HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion. Jede abgebildete Petrischale ist repräsentativ für 9 (HuH7-Leervektor) bzw. 5 (HuH7-Myoferlin-KD) weitere Petrischalen. Knockdown-Effizienz vgl. Abbildung 12. B: Statistische Auswertung: Mann-Whitney-Test $p=0,0005^{***}$.

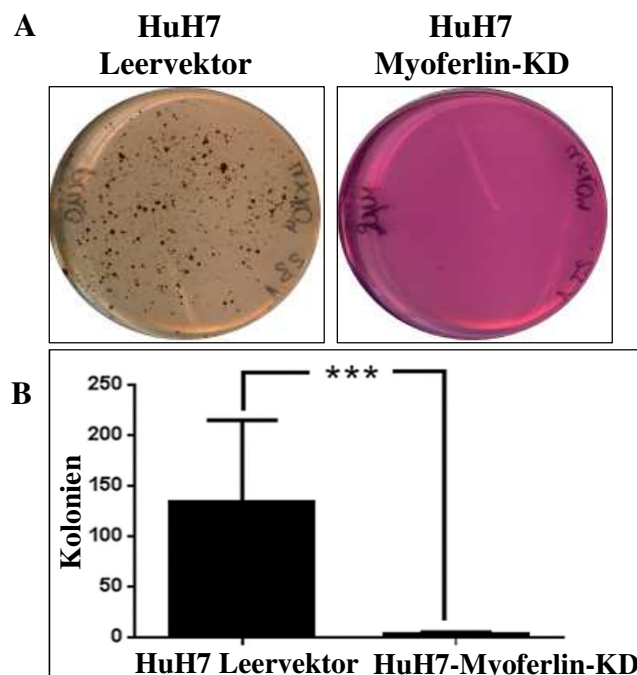


Abbildung 11. Verminderte Koloniebildung Myoferlin-depletierter Zellen auf Weichagar (40.000 ausgesäte Zellen).

A: Koloniebildung nach Knockdown von Myoferlin in HuH7-Zellen im Vergleich zu HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion. Die abgebildeten Petrischalen sind jeweils repräsentativ für 7 (HuH7-Leervektor) bzw. 10 (HuH7-Myoferlin-KD) Petrischalen. Knockdown-Effizienz vgl. Abbildung 12. B: Statistische Auswertung mittels t-Test: $p=0,0001^{***}$.

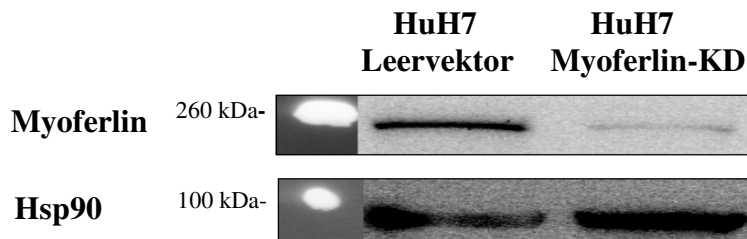


Abbildung 12. Nachweis der Knockdown-Effizienz von Myoferlin der in Abbildung 10 und Abbildung 11 aufgeführten Zelllinien.

C.2.2 Effekte der Depletion von Myoferlin auf die Zellzyklusverteilung

Um Effekte einer Depletion von Myoferlin in HuH7-Zellen auf die Zellzyklusverteilung zu evaluieren wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Hierbei wurden HuH7-Kontrollzellen mit HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion sowie Myoferlin-depletierten HuH7-Zellen (HuH7-Myoferlin-KD) verglichen. Die untersuchten Zelllinien wurden 7 Tage nach lentiviraler Transduktion für die Messung am Durchflusszytometer präpariert. Der Zeitraum nach 7 Tagen wurde gewählt, da aus der Literatur bekannt ist, dass ein Zellzyklus-Arrest im Rahmen der Onkogen-induzierten Seneszenz nicht sofort eintritt, sondern erst nach einer Zeitspanne von 7 Tagen auftritt (Serrano *et al.*, 1997).

Da die unbehandelten HuH7-Kontrollzellen in ersten Versuchen nach einer Proliferationszeit von 7 Tagen sehr stark konfluent waren, waren diese einer adäquaten Zellzyklusmessung nicht mehr zugänglich. Hierfür mussten erst die geeigneten Wachstumsbedingungen und Messparameter evaluiert werden, um die verglichenen Zelllinien unter gleichen Wachstumsbedingungen nach einem Zeitraum von 7 Tagen für die Zellzyklusmessung zu präparieren. Für die im Folgenden aufgeführten Versuche wurden jeweils 1×10^5 Zellen pro Zelllinie ausgesät. Am Tag nach dem Einbringen von shRNA wurden alle Zelllinien 1:4 gesplittet. Nach 6 Tagen Puromycin-Selektion bzw. Proliferation der unbehandelten Kontrollzelllinie wurden die Zellen für Messung am Durchflusszytometer geerntet. Die prozentuale Verteilung der gemessenen Zelllinien auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen ist in Tabelle 16 aufgeführt. Die Myoferlin-Expression der untersuchten Zelllinien zeigt Abbildung 13.

Tabelle 16. Prozentuale Verteilung auf die Zellzyklusphasen bei HuH7-Zellen in Abhängigkeit von Myoferlin.

Zelllinie	G1-Phase	S-Phase	G2-Phase
HuH7	38,8 %	1,45 %	59,4 %
HuH7-Leervektor	37,4 %	32 %	21,4 %
HuH7-Myoferlin-KD	36,8 %	21,8 %	28,7 %

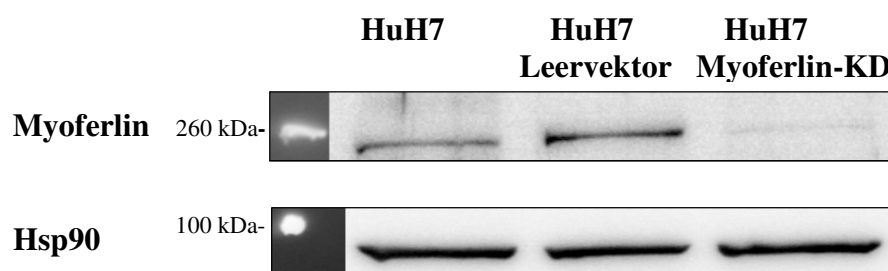


Abbildung 13. Myoferlin-Expression der für Zellzyklusanalysen (vgl. Tabelle 16) verwendeten Zelllinien.

C.2.3 Seneszenzassoziierte β -Galactosidase-Aktivität

Nach Depletion von MKL1/2 in HuH7-Zellen tritt nachweislich Onkogen-induzierte Seneszenz auf (Hampl *et al.*, 2013). Dies ging bei ca. 40 % der Zellen mit Seneszenz-assoziiierter β -Galactosidase-Aktivität einher (Hampl *et al.*, 2013). Um zu überprüfen, ob in den verwendeten Zelllinien nach Myoferlin-Depletion Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Aktivität auftritt, wurden die β -Galactosidase-Aktivität in Myoferlin-depletierten Zellen bestimmt. Myoferlin wurde durch lentivirale Transduktion mittels RNA-Interferenz in HuH7-Zellen depletiert, die Effizienz der Depletion ist in Abbildung 14 aufgeführt. Es konnte nach Myoferlin-Depletion im vorliegenden Versuch bei 3,7 % der Zellen (93 Zellen von 2500) Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Aktivität detektiert werden (vgl. Tabelle 17). Bei HuH7-Kontrollzellen und HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion war keine Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Aktivität feststellbar. Damit konnte im hier durchgeführten Experiment nach Myoferlin-Depletion nicht die nach MKL1/2-Depletion bei 40 % der Zellen aufgetretene erhöhte β -Galactosidase-Aktivität (Hampl *et al.*, 2013) beobachtet werden. Es konnte ein leichter Effekt auf die

Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Aktivität nach Myoferlin-Depletion festgestellt werden.

Tabelle 17. β -Galactosidase-Aktivität Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen.

Zelllinie	HuH7	HuH7 Leervektor	HuH7-Myoferlin-KD
% Zellen mit β -Galactosidase-Aktivität	<1%	<1%	3,7%

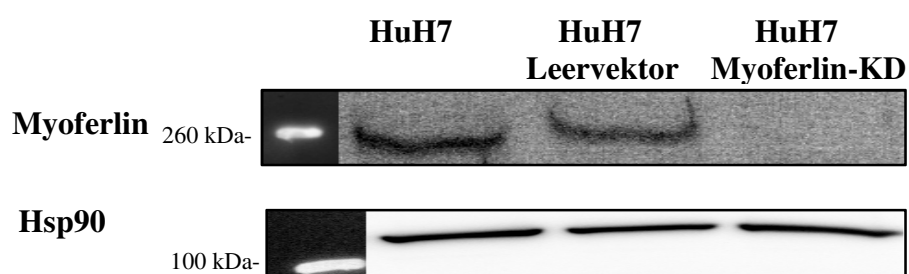


Abbildung 14. Effizienz der Myoferlin-Depletion der für Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase-Aktivität eingesetzten Zellen.

C.3 EXPRESSIONSANALYSEN

Die im folgenden Abschnitt aufgeführten Versuche dienen dazu, die Auswirkungen einer Myoferlin-Depletion auf die Expression verschiedener Proteine, die in Zusammenhang mit Signaltransduktionswegen stehen, näher zu untersuchen.

Zunächst wurde überprüft, in welchem Umfang die Myoferlin-Expression in HuH7-Zellen vom transkriptionellen Koaktivator MKL1 abhängig ist. Hierzu wurde nach Überexpression von MKL1 in HuH7-Zellen die Myoferlin-Expression analysiert.

Nach Depletion von MKL1/2 in hepatozellulären Karzinomzellen (HuH7-Zellen) ist eine verstärkte Aktivierung von ERK1/2 nachgewiesen (Hampl *et al.*, 2013). Im Folgenden wurde daher die Expression von ERK1/2 mittels Western Blot analysiert, um so zu überprüfen, inwieweit die Depletion von Myoferlin vergleichbare Effekte wie Knock-down von MKL1/2 in HuH7-Zellen hervorruft.

In weiteren Experimenten wurde die Expression des EGF-Rezeptors (*Epidermal Growth Factor Receptor*) in Myoferlin-depletierten Zellen analysiert. In Brustkrebszelllinien konnte gezeigt werden, dass die Depletion von Myoferlin die Degradation des EGF-Rezeptors hemmt (Turtoi *et al.*, 2013). Schließlich wurden Rekonstitutionsexperimente durchgeführt, um zu prüfen, ob Effekte einer Myoferlin-Depletion am EGF-Rezeptor von der MKL1/2-Expression in den untersuchten Zelllinien abhängen.

C.3.1 Abhängigkeit der Myoferlin-Expression von MKL1

Myoferlin wurde in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich mittels Mikroarray-Analysen als Zielgen der transkriptionellen Koaktivatoren Megakaryoblastic leukemia 1/2 (MKL1/2) identifiziert (Hampl, 2014; Hermanns *et al.*, 2017). Es konnte dabei nach MKL1/2-Knockdown in HuH7-Zellen eine verminderte Expression von Myoferlin festgestellt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte Myoferlin als MKL1-abhängiges Zielgen verifiziert werden.

Um MKL1-Abhängigkeit der Myoferlin-Expression zu überprüfen, wurde MKL1 transient in HuH7-Zellen transfiziert, um dadurch eine verstärkte Expression von MKL1 zu induzieren. Das verwendete Konstrukt für MKL1 enthielt einen FLAG-Antigen, durch das die Transfektion des Genkonstrukts nachgewiesen werden kann.

Durch die mittels transienter Transfektion erzielte Überexpression von MKL1 konnte eine verstärkte Expression von Myoferlin beobachtet werden (vgl. Abbildung 15). Dies impliziert, dass die Expression von Myoferlin vom transkriptionellen Koaktivator MKL1 abhängig ist.

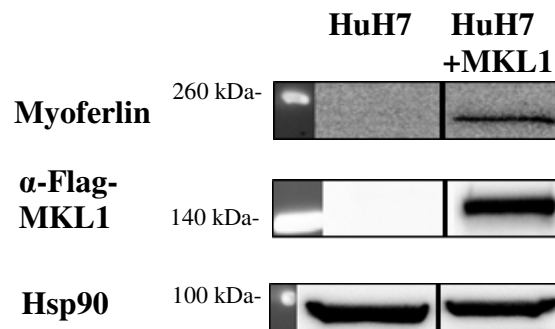


Abbildung 15. Überexpression von MKL1 führt zu verstärkter Myoferlin-Expression in HuH7-Zellen.

Nach transienter Transfektion von MKL1 in HuH7-Zellen zeigte sich eine verstärkte Myoferlin-Expression in Abhängigkeit von MKL1.

C.3.2 Validierung der Expression von pERK im Vergleich zur Gesamtmenge an ERK nach Myoferlin-Depletion

Aufgrund der beobachteten Abhängigkeit der Myoferlin-Expression von MKL1 und der Identifikation von Myoferlin als MKL1/2-abhängiges Zielgen in Vorarbeiten sollte im Folgenden die Effekte einer Myoferlin-Depletion auf die MAP-Kinase-Kaskade näher überprüft werden. Nach Depletion von MKL1/2 in HuH7-Zellen wird Seneszenz via Ras-MAP-Kinase-Signalweg und dem p16^{INK4a}-pRB-Signaltransduktionsweg induziert (Hampl *et al.*, 2013).

Als wichtige Komponente des MAP-Kinase-Signalwegs wurde die Expression von ERK untersucht. ERK ist eine Kinase, die als Bestandteil des MAP-Kinase-Signalwegs beispielsweise nach Aktivierung des EGF-Rezeptors phosphoryliert und aktiviert wird (Schoeberl *et al.*, 2002). Durch aktiviertes ERK werden weitere Proteine und Transkriptionsfaktoren reguliert (Schoeberl *et al.*, 2002). In HuH7-Zellen, die eine Depletion von MKL1/2 aufweisen, wurde eine erhöhte Expression von phosphoryliertem ERK festgestellt (Hampl *et al.*, 2013).

Um Effekte einer Depletion von Myoferlin auf die MAP-Kinase-Signalkaskade zu untersuchen, wurde die Expression des phosphorylierten ERK-Proteins im Vergleich zur gesamten ERK-Expression (ERK total) mittels Immunoblotting analysiert. Als Kontrollzelllinien wurden sowohl unbehandelte HuH7-Zellen als auch HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion eingesetzt. Es wurde der Zeitpunkt 7 Tage nach lentiviraler Transduktion untersucht.

7 Tage nach Myoferlin-Depletion konnte eine leichte Erhöhung der pERK-Expression festgestellt werden (vgl. Abbildung 16). Die Erhöhung der pERK-Expression wurde mittels Image J quantifiziert, indem die *Area under the curve* (AUC) der Intensitäten der einzelnen Banden bestimmt wurde (vgl. Tabelle 18). Die pERK-Expression war in Myoferlin-depletierten Zellen im Vergleich zu HuH7-Kontrollzellen leicht erhöht.

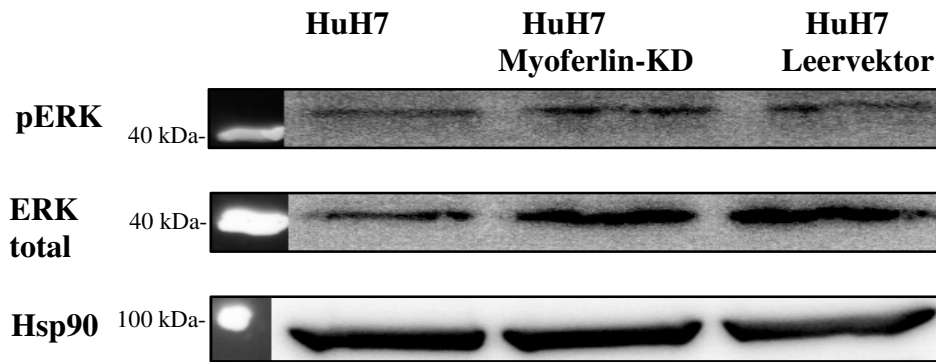


Abbildung 16. pERK- und ERKtotal-Expression in Myoferlin-depletierten HuH7-Zellen 7 Tage nach lentiviraler Transduktion.

Als Kontrollzelllinien wurden HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion und unbehandelte Kontrollzellen eingesetzt. Knockdown-Effizienz vgl. Abbildung 17.

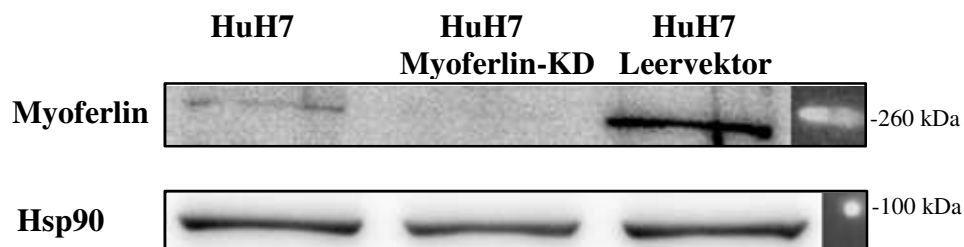


Abbildung 17. Nachweis der Depletion von Myoferlin bei den in Abbildung 16 aufgeführten Proben.

Tabelle 18. Quantifizierung pERK-Expression Myoferlin-depletierter HuH7-Zellen im Vergleich zu Kontrollzelllinien 7 Tage nach lentiviraler Transduktion mittels Image J.

Zelllinie	AUC (Area under the Curve)
HuH7	29681,936
HuH7-Myoferlin-KD	43536,442
HuH7-Leervektor	36200,149

C.3.3 Validierung der Expression des *Epidermal-Growth-Faktor-Rezeptors* (EGFR) im Zeitverlauf

Eine Veröffentlichung von Turtoi *et al.* (2013) legt nahe, dass Myoferlin an der Degradation des „*Epidermal-Growth-Factor*“-Rezeptors (EGFR) beteiligt ist. Daher wurde im Folgenden analysiert, welche Effekte eine Depletion von Myoferlin in hepatozellulären Karzinomzellen auf die Expression des EGF-Rezeptors hat. Dafür wurden Myoferlin-depletierte Zellen im Vergleich zu HuH7 unbehandelten Kontrollzellen und HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion untersucht. Für die im Folgenden aufgeführten Analysen wurden Zellen zu den Zeitpunkten 24 h, 48 h sowie 4 und 7 Tage nach lentiviraler Transduktion für Western-Blot-Analysen geerntet.

C.3.3.1 Expression des EGF-Rezeptors 24 und 48 Stunden nach Myoferlin-Depletion

Zunächst wurde die Expression des gesamten EGF-Rezeptors (EGFR total) im Zeitraum von 24 bzw. 48 Stunden nach lentiviraler Transduktion mittels Western-Blot-Analysen bestimmt.

24 Stunden nach Myoferlin-Depletion war keine erhöhte Expression des EGF-Rezeptors in Myoferlin-depletierten HuH7-Zellen im Vergleich HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion oder unbehandelten Kontrollzellen zu beobachten (vgl. Abbildung 18). Die Expression des EGF-Rezeptors war nach 24 h in Myoferlin-depletierten Zellen geringer als bei den Kontrollzelllinien. Nach 48 h konnte in Myoferlin-depletierten Zellen eine erhöhte Expression des EGF-Rezeptors im Vergleich zu HuH7 unbehandelten Kontrollzellen festgestellt werden, die jedoch vergleichbar mit der Expression des EGF-Rezeptors in HuH7 mit lentiviraler Transduktion des Leervektors waren (vgl. Abbildung 18). Abbildung 19 zeigt die Effizienz der Myoferlin-Depletion in den untersuchten Zelllinien.

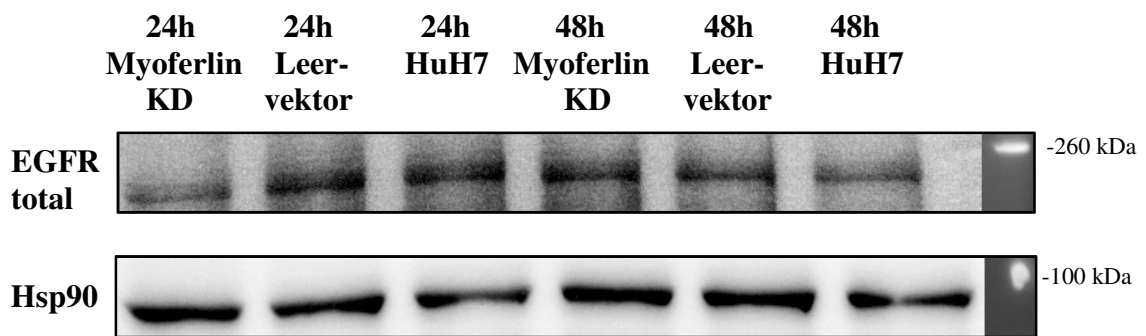


Abbildung 18. Expression des EGF-Rezeptors 24 und 48 Stunden nach Myoferlin-Depletion.

Als Kontrollzelllinien wurden HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion und unbehandelte Kontrollzellen eingesetzt. Knockdown-Effizienz vgl. Abbildung 19.

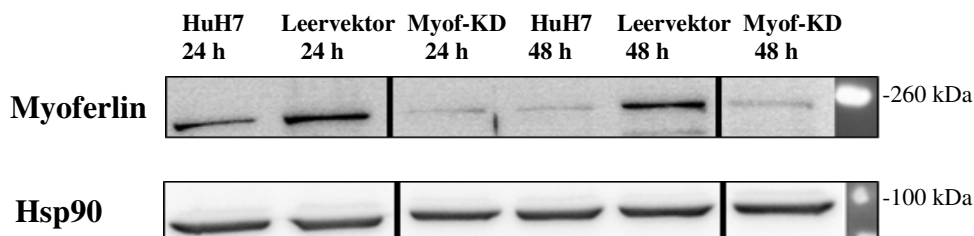


Abbildung 19. Nachweis der Depletion von Myoferlin bei den in Abbildung 18 aufgeführten Proben.

Aufgeführt sind HuH7-Kontrollzellen, HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion und Myoferlin-depletierte Zellen jeweils 24 und 48 Stunden nach lentiviraler Transduktion.

C.3.3.2 Expression des EGF-Rezeptors im Zeitraum von 4 und 7 Tagen nach Myoferlin-Depletion

Um die Expression des EGF-Rezeptors im weiteren Zeitverlauf zu beurteilen, wurden weitere Zeitpunkte nach lentiviraler Transduktion bestimmt. Hierfür wurden 4 und 7 Tage nach lentiviraler Transduktion Zellen für Western-Blot-Analysen geerntet.

4 Tage nach Myoferlin-Depletion mittels lentiviraler Transduktion zeigen erste Ergebnisse eine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors im Vergleich zu HuH7-Kontrollzellen (vgl. Abbildung 20). Zusätzlich wurde hier die Expression des an Tyrosin 1173 phosphorylierten und aktivierten EGF-Rezeptors bestimmt (pEGFR^{Y1173}). Die Expression des phosphorylierten EGF-Rezeptors war bei Myoferlin-depletierten HuH7-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen unverändert.

7 Tage nach Myoferlin-Depletion konnte in allen untersuchten Proben eine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors nachgewiesen werden. Diese verstärkte Expression war in drei unabhängig voneinander lentiviral transduzierten Proben detektierbar (vgl. exemplarisch Abbildung 21).

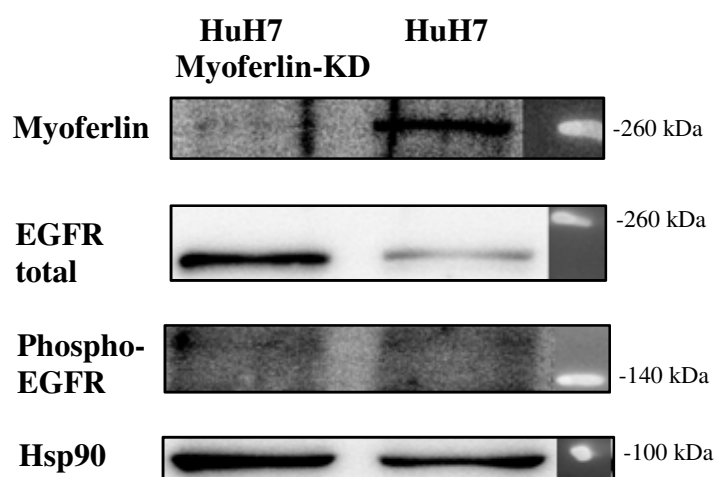


Abbildung 20. Expression EGF-Rezeptor 4 Tage nach lentiviraler Transduktion.

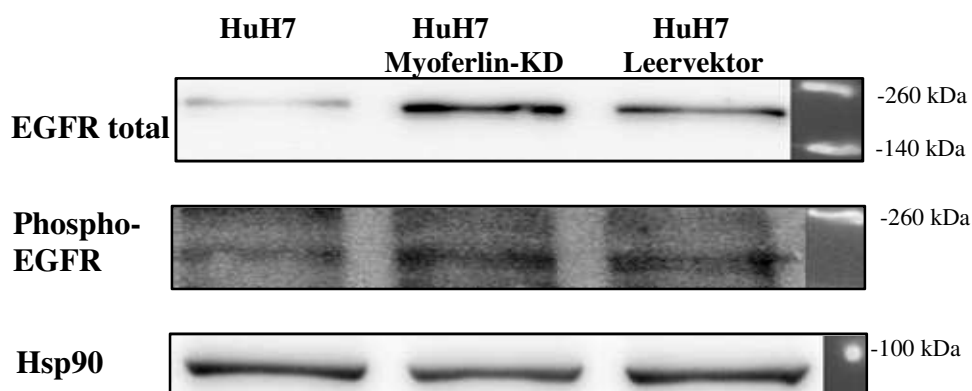


Abbildung 21. Expression EGF-Rezeptor und pEGFR 7 Tage nach lentiviraler Transduktion (Knockdown-Effizienz vgl. Abbildung 17, S. 68).

C.3.4 Rekonstitution

Myoferlin wurde sowohl in Mikroarray-Analysen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich als auch in der vorliegenden Arbeit durch Transfektion von MKL1 und dadurch gesteigerte Myoferlin-Expression (vgl.C.3.1) als potientiell MKL1-abhängiges Zielgen identifiziert. Um zu untersuchen, ob die beobachteten Effekte am EGF-Rezeptor vom transkriptionellen Koaktivator MKL1 abhängig sind, wurden Rekonstitutionsexperimente durchgeführt. Dazu wurden HuH7-Zellen transient mittels Lipofectamin mit einem Myoferlin-Plasmid transfiziert um somit eine verstärkte Myoferlin-Expression zu erzielen. Zusätzlich wurden diese Zellen durch lentivirale Transduktion mit MKL1/2-shRNA mit einem stabilen MKL1-Knockdown versehen. Als Kontrollzellen dienten HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion, die vor lentiviraler Transduktion mit Myoferlin transient transfiziert worden waren. Durch die transiente Transfektion von Myoferlin wurde eine deutliche Überexpression von Myoferlin erzielt (vgl. Abbildung 22 und Abbildung 23).

Die Expression des EGF-Rezeptors wurde 24 und 48 Stunden nach lentiviraler Transduktion untersucht. Hier zeigte sich nach Myoferlin-Transfektion sowohl in MKL1-depletierten Zellen als auch in HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion kein Unterschied in der Expression des EGF-Rezeptors im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (vgl. Abbildung 22, Abbildung 23). Nach 48 h wurde außer der Expression des EGF-Rezeptors zusätzlich die gesammte ERK-Expression (ERKtotal) sowie die Expression von phosphoryliertem ERK bestimmt. Die ERKtotal-Expression war in allen untersuchten Zelllinien gleich stark ausgeprägt. Bei der Expression des phosphorylierten EGF-Rezeptors konnte eine leichte Erhöhung der phospho-ERK-Expression bei Myoferlin-Überexpression in MKL1-depletierten HuH7-Zellen beobachtet werden (vgl. Abbildung 23).

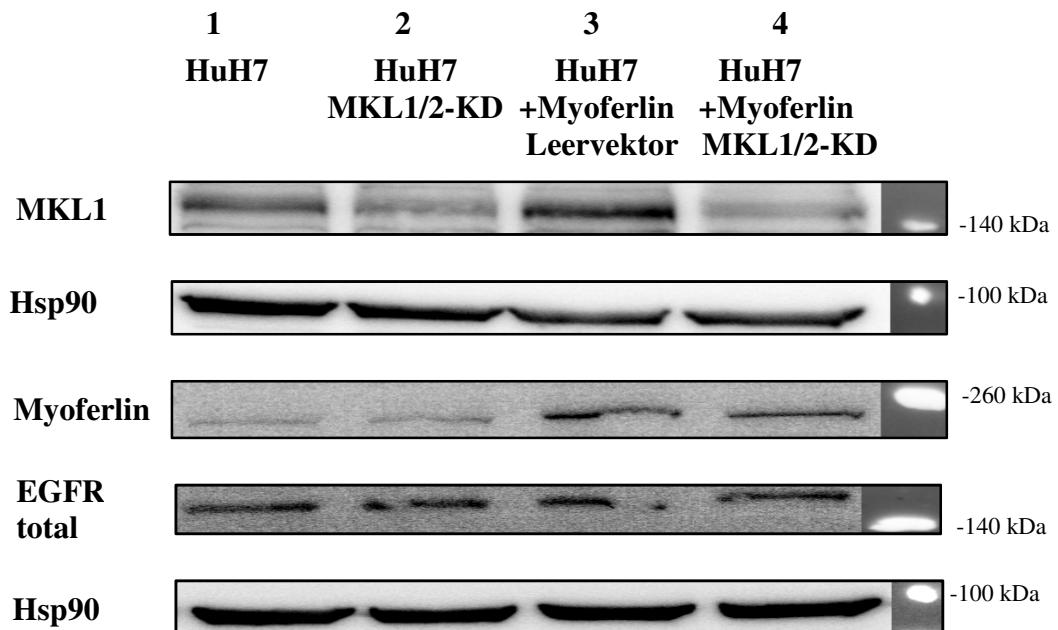


Abbildung 22. Rekonstitutionsexperiment 24 h nach lentiviraler Transduktion, Nachweis der MKL1 und Myoferlin-Expression sowie der Expression des EGF-Rezeptors.

Die linke Bande (1) zeigt unbehandelte HuH7-Kontrollzellen. In Bande Nr. 2 sind durch lentivirale Transduktion von MKL1/2shRNA hergestellte MKL1-depletierte HuH7-Zellen aufgetragen. Die dritte Bande stammt aus HuH7-Zellen, in die Myoferlin transient transfiziert wurde sowie eine lentivirale Transduktion mit Leervektor-shRNA durchgeführt wurde. Die Bande Nr. 4 zeigt Myoferlin-transfizierte Zellen mit lentiviraler Transduktion von MKL1/2shRNA.

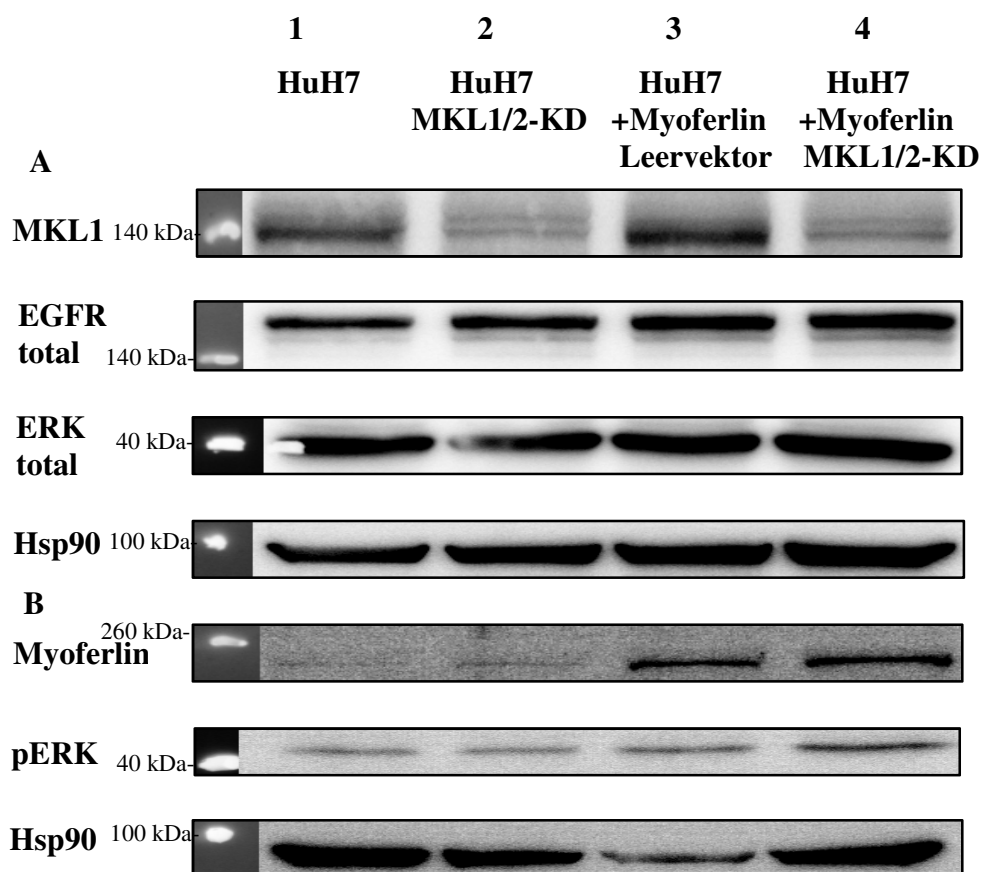


Abbildung 23. Rekonstitution 48 h nach lentiviraler Transduktion, Nachweis der MKL1- und Myoferlin-Expression sowie der Expression von EGFRtotal, ERKtotal und phospho-ERK.

In der linken Bande (1) sind HuH7-Kontrollzellen aufgeführt. Die zweite Bande zeigt HuH7-Zellen mit lentiviraler Transduktion von MKL1/2shRNA. Die Bande Nr. 3 entspricht Myoferlin-überexprimierenden HuH7-Zellen mit zusätzlicher Leervektor-Transduktion. In Bande Nr. 4 sind Myoferlin-überexprimierende HuH7-Zellen mit zusätzlicher lentiviraler Transduktion von MKL1/2shRNA dargestellt.

D. DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Tumorigenese hepatozellulärer Karzinomzellen in Abhängigkeit von MKL1/2, DLC1 und Myoferlin im Zellkulturmodell näher zu untersuchen. In Befunden der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich, zu denen die vorliegende Arbeit einen Beitrag geleistet hat, wurde eine Depletion von MKL1/2 in hepatozellulären Karzinomzelllinien (HuH7-Zellen) mit Onkogen-induzierter Seneszenz in Verbindung gebracht (Hampl *et al.*, 2013). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Proliferationsarrest nach MKL1/2-Depletion näher analysiert und das Wachstumsverhalten in Abhängigkeit vom Tumorsuppressor DLC1 beurteilt.

Myoferlin konnte als MKL1-abhängiges Zielgen identifiziert werden, das mit den Effekten von MKL1/2 auf die Proliferation hepatozellulärer Tumorzellen in Zusammenhang steht (Hermanns *et al.*, 2017). Aus diesem Grund wurden Effekte einer Myoferlin-Depletion in HuH7-Zellen untersucht. Hierbei wurde einerseits das Wachstumsverhalten nach Myoferlin-Depletion analysiert. Dies diente insbesondere dazu, Auswirkungen von Myoferlin auf das autonome Wachstumsverhalten von HuH7-Zellen zu beurteilen. Zudem sollten Zellzyklusanalysen und die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität Aufschluss darüber geben, ob nach Myoferlin-Knockdown in HuH7-Zellen eine Veränderung der Zellzyklusprogression auftritt oder Hinweise auf die Induktion von Seneszenz vorliegen. Des Weiteren wurden Expressionsanalysen nach Myoferlin-Depletion durchgeführt, durch die die Aktivierung verschiedener Proteine, die in Zusammenhang mit verschiedenen Signalwegen stehen, näher analysiert wurde.

D.1 STATISTISCHE ANALYSE

Bei den in dieser Dissertationsarbeit durchgeführten statistischen Analysen wurden sowohl bei durchflusszytometrischen Daten zur Zellzyklusanalyse als auch bei Weichagar-tests zur Analyse des autonomen Wachstumsverhaltens von Zellen die Daten zunächst auf Normalverteilung getestet. Der Shapiro-Wilk-Test ist einer der aussagekräftigsten Tests auf Normalverteilung (Razali & Wah, 2011). Bei vergleichsweise geringer Stichprobenanzahl bei den durchflusszytometrischen Daten konnte kein Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung durchgeführt werden. Falls aufgrund zu geringer Stichprobenzahl

kein Shapiro-Wilk-Test möglich war, wurde die graphische Auswertung mittels QQ-Plots erstellt, um die Verteilung der Proben zu visualisieren. QQ-Plots geben ebenfalls Hinweise auf Normalverteilung (Henderson, 2006). Diese stellen eine ebenfalls effektive Methode dar, auf Normalverteilung zu testen (Razali & Wah, 2011). QQ-Plots wurden für kleine Stichproben gewählt, um dennoch ein visuell überprüfbares Mittel zu haben, in dem Fall, in dem Normalitätstests nicht durchführbar sind.

D.2 VALIDIERUNG DES AUTONOMEN WACHSTUMSVERHALTENS AUF WEICHAGAR IN ABHÄNGIGKEIT VON DLC1 UND MKL1/2

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurden Weichagartests zur Beurteilung des autonomen Wachstumsverhaltens der untersuchten Zelllinien durchgeführt. Die Koloniebildung auf Weichagar steht in Zusammenhang mit der Tumorigenität einer Zelllinie (Cifone, 1982). Das autonome Zellwachstum auf Weichagar wurde zunächst in HepG2-Zellen, einer epithelialen Hepatoblastomzelllinie, untersucht (López-Terrada *et al.*, 2009). Es ist bereits in der Literatur beschrieben, dass HepG2-Zellen auf Weichagar Kolonien bilden können (García-Vilas *et al.*, 2015). HepG2-Zellen exprimieren den Tumorsuppressor DLC1 und zeichnen sich durch zytoplasmatische Lokalisation der transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2 aus (Mühlich *et al.*, 2012). Nach Ausschalten des Tumorsuppressors DLC1 konnte in der vorliegenden Arbeit eine signifikant verstärkte Koloniebildung auf Weichagar festgestellt werden. Diese Erhöhung des autonomen Zellwachstums war bei allen ausgesäten Zellkonzentrationen in HepG2-Zellen nach Anwendung eines Mann-Whitney-Tests statistisch hoch signifikant ($p=0,0003^{***}$ (2×10^4 ausgesäte Zellen), $p=0,0002^{***}$ (4×10^4 ausgesäten Zellen) vgl. Tabelle 9, S. 49; Abbildung 2 und Abbildung 3, S. 50). Dieser Befund deutet darauf hin, dass in HepG2-Zellen nach Ausschalten von DLC1 die Tumorigenität zunimmt. Xue *et al.* (2008) haben bereits die Effekte des Tumorsuppressors DLC1 in Hepatoblasten untersucht. In den Experimenten von Xue *et al.* (2008) zeigte sich, dass die Depletion von DLC1 in Hepatoblasten mittels RNA-Interferenz und anschließender Implantation dieser Zellen in die Leber von Mäusen die Tumorigenität fördert. Interessanterweise konnte im Zellkulturmodell im Koloniebildungstest *in vitro* kein signifikanter Unterschied im Vergleich der DLC1-exprimierenden Zellen zu DLC1-defizienten Zellen festgestellt werden (Xue *et al.*,

2008). Die Diskrepanz zu den hier aufgeführten Ergebnissen könnte auf die unterschiedlichen Versuchsansätze und Wachstumsbedingungen zurückzuführen sein. Bei Xue *et al.* (2008) wurde die Koloniebildungseffizienz auf Zellkulturschalen beurteilt, in den hier vorliegenden Experimenten wurde im Gegensatz dazu die Koloniebildung in semisolidem Agarmedium beurteilt. Interessant ist hierbei, dass DLC1-exprimierende HepG2-Kontrollzellen im hier verwendeten semisoliden Agarmedium ohne Adhäsion an ein Zellkulturgefäß eine sehr geringe Koloniebildung aufweisen, aber die Fähigkeit zur Koloniebildung durch Verlust von DLC1 signifikant zunimmt. Eventuell könnte daher die Adhäsion ein entscheidender Faktor der Proliferation von DLC1-defizienten Zelllinien sein. In weiterführenden Experimenten wäre die Durchführung eines Koloniebildungstests auf Zellkulturschalen analog den Experimenten von Xue *et al.* (2008) sinnvoll, um die Koloniebildungseffizienz der hier eingesetzten HepG2-Zellen zu überprüfen.

Im Einklang mit den hier aufgeführten Ergebnissen ist in der Literatur bereits bei Zelllinien aus anderen Tumorentitäten eine vermehrte Koloniebildung auf Weichagar nach Ausschalten des Tumorsuppressors DLC1 bekannt. So zeigt die Zelllinie LoVo als humane Kolonkarzinomzelllinie ebenfalls eine stark vermehrte Koloniebildung auf Weichagar nach Depletion von DLC1 (Jin *et al.*, 2008). Bei Zelllinien aus dem Nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) ist bereits beschrieben, dass die Rekonstitution von DLC1 in DLC1-defizienten Zellen die Proliferation auf Weichagar vermindert (Healy *et al.*, 2008). Dieser Zusammenhang einer verminderten Koloniebildung auf Weichagar nach Rekonstitution von DLC1 ist auch für hepatozelluläre Karzinomzelllinien (SMMC-7721-Zellen) beschrieben (Wong *et al.*, 2005). In Versuchen von Yang *et al.* (2016) in DLC1-defizienten HuH7-Zellen führte die Rekonstitution von DLC1 in Kombination mit einer shRNA-Leervektorsequenz zu verminderter Koloniebildung auf Weichagar.

Der Verlust des Tumorsuppressors DLC1 führt zur tumorigenen Transformation hepatozellulärer Karzinomzellen unter Beteiligung von MKL1/2 (Mühlich *et al.*, 2012). MKL1/2 wirken als transkriptionelle Koaktivatoren von SRF, dadurch werden SRF-abhängige Zielgene induziert (Cen *et al.*, 2003; Selvaraj & Prywes, 2003). Durch Depletion von MKL1/2 in DLC1-defizienten HuH7-Zellen ist eine verminderte Koloniebildung auf Weichagar beschrieben (Mühlich *et al.*, 2012). Um zu überprüfen, welche Auswirkungen die Depletion von MKL1/2 in DLC1-exprimierenden HepG2-Zellen auf das

autonome Zellwachstum hat, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Weichagartests durchgeführt. Es wurden dabei MKL1/2-depletierte HepG2-Zellen mit HepG2-Kontrollzellen verglichen. In DLC1-exprimierenden HepG2-Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Koloniebildungsverhalten auf Weichagar nach Depletion von MKL1/2 (vgl. Tabelle 10 und Abbildung 4, S. 51). Dies stellt einen Hinweis darauf dar, dass das autonome Zellwachstum von HepG2 von der Expression des Tumorsuppressors DLC1 abhängig sein könnte. Die Koloniebildung von HepG2-Kontrollzellen war insgesamt gering ausgeprägt im Vergleich zu in der Literatur veröffentlichten Daten bei García-Vilas *et al.* (2015). Dies könnte auf methodische Unterschiede beim Weichagartest zurückzuführen sein. Für die von García-Vilas *et al.* (2015) aufgeführten Daten wurde ein anderes Protokoll für den Weichagartest verwendet, was durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau das Wachstumsverhalten beeinflussen könnte.

Der Befund, dass nach MKL1/2-Depletion in DLC1-exprimierenden HepG2-Zellen kein verstärktes autonomes Zellwachstum zu beobachten ist, ist bedeutsam für den Zusammenhang von MKL1/2 und DLC1 bei der Tumorigenese. In DLC1 defizienten hepatozellulären Karzinomzellen (HuH7-Zellen) ist MKL1/2 nukleär lokalisiert (Mühlich *et al.*, 2012). In HepG2-Zellen ist eine zytoplasmatische Lokalisation von MKL1/2 bekannt (Mühlich *et al.*, 2012). Nach Rekonstitution von DLC1 in HuH7-Zellen zeigt sich ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisation von MKL1/2 (Mühlich *et al.*, 2012). Eine nukleäre Lokalisation von MKL1/2 nach Depletion von DLC1 steht in Zusammenhang mit der Aktivierung tumor-relevanter Zielgene (Mühlich *et al.*, 2012) und könnte eventuell zum beobachteten Wachstumsverhalten von DLC1-depletierten HepG2-Zellen auf Weichagar beitragen. Bei Ausschalten von MKL1/2, welches zytoplasmatisch lokalisiert ist (Mühlich *et al.*, 2012), ist dieser Effekt nicht zu beobachten.

D.3 ZELLZYKLUSVERHALTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DLC1 UND MKL1/2

Um zu überprüfen, ob eine Depletion von MKL1/2 in DLC1-exprimierenden HepG2-Zellen eine veränderte Zellzyklusverteilung bewirkt, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt.

HepG2-Zellen wurden zunächst mit HepG2-DLC1-depletierten Zellen verglichen. Insbesondere wurde die G1-Phase analysiert, um zu überprüfen, ob eine Arretierung in der G1-Phase auftritt. Eine Arretierung in der G1-Phase steht mit vielen zellulären Prozessen in Zusammenhang, beispielsweise zeigen Zellen, die in die Seneszenz eingetreten sind, eine Arretierung in der G1-Phase (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007). In den durchgeführten Experimenten zeigte sich keine Arretierung in der G1-Phase in HepG2-Zellen nach Depletion von DLC1 (vgl. Tabelle 11 und Abbildung 5, S. 53). Dies steht in Einklang mit den oben aufgeführten Befunden einer verstärkten Proliferation DLC1-defizienter Zellen auf Weichagar. Dieser Befund könnte so erklärt werden, dass sich ein relativ hoher Anteil an Zellen in der Synthese-Phase des Zellzyklus befindet (40,3 % der DLC1 depletierten HepG2-Zellen, *SD* 3,7), dadurch könnte die Proliferation auch in semisolidem Agarmedium begünstigt sein.

Bei Kolonkarzinomzelllinien (LoVo-Zellen) konnte nach Depletion von DLC1 eine Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus festgestellt werden (Jin *et al.*, 2008). Bei den Befunden von Jin *et al.* (2008) befanden sich nach DLC1-Depletion 56,65 % der LoVo-Zellen in der G1-Phase, während in DLC1-depletierten HepG2 lediglich 38,1 % (*SD* 1,15) der Zellen in der G1-Phase befinden. Dies könnte auf die unterschiedlichen untersuchten Tumorentitäten zurückzuführen sein. Eventuell kommt bei Kolonkarzinomzelllinien ein anderer zellulärer Mechanismus nach DLC1-Depletion in Bezug auf die Zellzyklusregulation zum Tragen. Jin *et al.* (2008) führen den beobachteten Effekt darauf zurück, dass Zellen, die DLC1 exprimieren, in der G2/ M-Phase arretiert sind. Nach dem Ausschalten von DLC1 kommt es zu einer Änderung des Zellzyklus in Richtung eines G1-Arrests (Jin *et al.*, 2008). In HepG2-Zellen stellen sich die Verhältnisse anders dar. Hier ist in HepG2-Kontrollzellen keine Arretierung in der G2-Phase zu beobachten, die mit den Daten von Jin *et al.* (2008) in LoVo-Kontrollzellen vergleichbar wären. Es befinden sich in den Kontrollzellen 22,7 % (*SD* 4,7) der Zellen in der G2-Phase, während bei Jin *et al.* (2008) eine G2-Arretierung mit 49,29 % der Zellen in der G2-Phase auftritt. Es scheint bei vergleichbaren Ergebnissen aus den Weichagarexperimenten bei DLC1-depletieren Zellen (vgl. D.2) die Zellzyklusregulation in anderer Art und Weise betroffen sein. Befunde von Wang *et al.* (2014) zeigen bei einer anderen humanen Kolonkarzinomzelllinie (SW480) auf, dass die Überexpression von DLC1 zu

einer Arretierung in der G1-Phase führt. Dies geht mit der Induktion von Apoptose einher (Wang *et al.*, 2014). Zhou *et al.* (2004) hatten andererseits in hepatozelluläre Karzinomzelllinien (Focus und 7703K-Zellen) festgestellt, dass die G1- und G2-Phase nicht von der DLC1-Expression beeinflusst wird, jedoch nach dem Einbringen von DLC1 Apoptose hervorgerufen wird. Vermutlich sind die Auswirkungen des Tumorsuppressors DLC1 stark vom zellulären Kontext und der Tumorentität abhängig.

Um zu untersuchen, ob die Zellzyklusprogression von der MKL1/2-Expression in DLC1-exprimierenden HepG2-Zellen abhängig ist, wurden weitere Zellzyklusanalysen durchgeführt. Dabei wurde die Zellzyklusverteilung MKL1/2-depletierter HepG2-Zellen im Vergleich zu HepG2-Kontrollzellen untersucht. Die Zellzyklusanalyse zeigte keine Abweichung der Zellzyklusphasen der MKL1/2-depletierten HepG2-Zellen zu HepG2-Kontrollzellen, bei Analyse der G1-Phase trat kein statistisch signifikanter Unterschied auf (vgl. Tabelle 12, Abbildung 6, S. 54). In den durchgeführten Weichagar-tests dieser Zelllinien hatte sich in Einklang damit keine Veränderung des autonomen Wachstums auf semisolidem Medium nach MKL1/2-Depletion in HepG2-Zellen ergeben (vgl. D.2), die Zelllinien zeigten ein vergleichbares Wachstumsverhalten auf Weichagar. Um die Abhängigkeit des Zellzyklusverhaltens in Abhängigkeit von DLC1 weiter zu untersuchen, wurde eine hepatozelluläre Tumor-Zelllinie (HuH7-Zellen) hinzugezogen, welche den Tumorsuppressor DLC1 nicht exprimiert (Mühlich *et al.*, 2012; Ng *et al.*, 2000). In diesen Zellen wurde analysiert, welche Auswirkungen eine Depletion von MKL1/2 in Abwesenheit von DLC1 zu Folge hat. In den untersuchten HuH7-Zellen wurde insbesondere die Arretierung in der G1-Phase untersucht. Es zeigte sich in drei unabhängig voneinander durchgeführten Messungen ein Unterschied in der Anzahl an Zellen in der G1-Phase (vgl. Tabelle 13, S. 55; Abbildung 7, S. 56). Nach MKL1/2-Depletion zeigte sich hier eine Arretierung in der G1-Phase, die statistisch signifikant ist ($p=0,0113^*$ bei Anwendung eines ungepaarten, zweiseitigen t-Tests, vgl. C.1.2.3). Dieser Befund stellt einen Hinweis dar, dass diese Zellen in die Seneszenz eingetreten sein könnten, nachdem seneszente Zellen eine Arretierung in der G1-Phase aufweisen. (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Dimri *et al.*, 1995). In weiterführenden Experimenten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nach Depletion von MKL1/2 in DLC1-defizienten HuH7-Zellen Seneszenz eintritt (Hampl *et al.*, 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass nach Reintroduktion von DLC1 in HuH7-Zellen Seneszenz

induziert wird (Hampl *et al.*, 2013). Die hier gewonnenen Ergebnisse haben somit einen Beitrag dazu geleistet, die Proliferation in DLC1 defizienten Tumorzellen zu beurteilen. Eventuell ist der beobachtete Effekt in HepG2 Zellen auf das autonome Zellwachstum (vgl. D.2) und das Zellzyklusverhalten (vgl. D.3) im Kontext mit der DLC1-Expression dieser Zellen zu sehen.

D.4 VALIDIERUNG VON MYOFERLIN ALS MKL1-ABHÄNGIGES ZIELGEN

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Abhängigkeit der Myoferlin-Expression von MKL1 evaluiert. Aus DNA-Microarray-Analysen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich ist bereits bekannt, dass Myoferlin in MKL1/2-depletierten HuH7-Zellen vermindert exprimiert wird (Hermanns *et al.*, 2017).

Durch transiente Transfektion von MKL1 mittels Lipofectamin® 2000 in HuH7-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit eine verstärkte Expression von MKL1 hervorgerufen. Mittels Western-Blot-Analysen wurde die Myoferlin-Expression der untersuchten Zelllinien (HuH7-Zellen und HuH7-Zellen mit MKL1-Transfektion) überprüft. Es zeigte sich eine im Vergleich zu Kontrollzellen verstärkte Myoferlin-Expression (vgl. Abbildung 15, S. 66). Dieser Versuch stellt einen wichtigen Hinweis dar, dass Myoferlin ein von MKL1-abhängiges Zielgen ist. Die nukleäre Lokalisation von MKL1 steht mit der RhoA-Aktivität in Zusammenhang (Mühlich *et al.*, 2012). Der Verlust von DLC1 in HuH7-Zellen führt zu verstärkter RhoA-Aktivierung, wodurch MKL1/2 nukleär akkumuliert (Mühlich *et al.*, 2012). Bei Hermanns *et al.* (2017) konnte in weiterführenden Versuchen ein Zusammenhang von Myoferlin mit der RhoA-Aktin-MKL-Signalachse hergestellt werden.

D.5 WACHSTUMSVERHALTEN IN ABHÄNGIGKEIT VON MYOFERLIN

Um die Effekte von Myoferlin auf das Wachstumsverhalten hepatozellulärer Karzinomzellen (HuH7-Zellen) näher zu untersuchen, wurden bei Myoferlin-depletierten HuH7-Zellen Weichagar-Tests und durchflusszytometrische Analysen durchgeführt sowie die Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Es sollte dabei vor allem

überprüft werden, ob die Depletion von Myoferlin in DLC1-defizienten HuH7-Zellen ähnliche Effekte auf das zelluläre Wachstumsverhalten hervorruft wie die Depletion von MKL1/2 in HuH7-Zellen. Eingesetzt wurden Myoferlin-depletierte HuH7-Zellen, die mittels lentiviraler Transduktion generiert wurden.

D.5.1 Myoferlin-Depletion bewirkt signifikant verminderte Koloniebildung auf Weichagar

Nach Depletion von MKL1/2 in HuH7-Zellen ist eine verminderte Koloniebildung auf Weichagar beschrieben (Mühlich *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einer Depletion von Myoferlin in HuH7-Zellen mittels Weichagar-Analysen untersucht. Myoferlin wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in HuH7-Zellen durch RNA-Interferenz mittels shRNA ausgeschaltet. Als Kontrollzellen wurden einerseits unbehandelte HuH7-Zellen eingesetzt. Des Weiteren wurde eine lentivirale Transduktion mittels Leervektor-shRNA durchgeführt, um die Auswirkungen der lentiviralen Transduktion auf das Wachstumsverhalten zu bestimmen.

Durch die lentivirale Transduktion, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurde, ergab sich eine sehr effiziente Depletion von Myoferlin im Vergleich zu Kontrollzelllinien (vgl. Abbildung 8 B, S. 58; Abbildung 12, S. 62). Bei Myoferlin-depletierten HuH7-Zellen zeigte sich eine signifikant verminderte Koloniebildung im Vergleich zu HuH7-Kontrollzelllinien und Kontrollzellen mit Leervektor-Transduktion ($p=0,0108^*$). Bei den durchgeführten Weichagartests konnte festgestellt werden, dass Kontrollzellen, bei denen eine lentivirale Transduktion mit Leervektor-shRNA durchgeführt worden war, ein vermindertes Wachstum auf Weichagar im Vergleich zu HuH7-Kontrollzellen aufwiesen (vgl. Abbildung 9, Tabelle 14, S. 59). Bei HuH7-Kontrollzellen zeigte sich eine große Schwankungsbreite der Koloniebildung pro Petrischale. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Koloniebildung zwischen den untersuchten Kontrollzelllinien wäre, dass in dem vorliegenden Versuch die Leervektor-shRNA in einem Bereich inseriert hat, der einen Effekt auf das autonome Zellwachstum ausübt. Um den Effekt der Leervektor-Insertion im Vergleich zu Myoferlin-Depletion genauer und mit einer höheren Stichprobenanzahl zu evaluieren, wurden weitere Experimente mit HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion und Myoferlin-depletierten Zellen durchgeführt.

In den durchgeführten Weichagartests zeigten Myoferlin-depletierte Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen statistisch hoch signifikante Reduktion des Wachstums auf Weichagar. Sowohl bei 20.000 als auch bei 40.000 ausgesäten Zellen konnte eine hoch signifikant verminderte Koloniebildung im Weichagar festgestellt werden (20.000 ausgesäte Zellen: $p=0,0005^{***}$, 40.000 ausgesäte Zellen: $p=0,0001^{***}$; Tabelle 15, S. 60; Abbildung 10 und Abbildung 11, S. 61). Dieser Befund stellt einen wichtigen Hinweis dar, dass Myoferlin eine Rolle bei der Tumorigenese spielt. Maligne transformierte Zellen besitzen die Fähigkeit, auf Weichagar Kolonien zu bilden (Borowicz *et al.*, 2014). Das Wachstum auf Weichagar kann als ein *in vitro*-Maß der Tumorigenität angesehen werden (Cifone, 1982).

In der Literatur finden sich Befunde anderer Tumorentitäten, die auf verminderte tumorigene Eigenschaften Myoferlin-depletierter Zellen hinweisen. So ist beispielsweise nach Leung *et al.* (2013) Myoferlin mit der Tumorigenität der murinen Lungenkarzinomzelllinie LLC (Lewis Lungenkarzinom) assoziiert. Das Ausschalten von Myoferlin reduziert die Zellproliferation von LLC-Zellen *in vitro* und führte zu einer Verminderung der Tumorlast in einem Maus-Modell mit Myoferlin-depletierten LLC-Zellen (Leung *et al.*, 2013). Des Weiteren konnten Li *et al.* (2012) zeigen, dass eine Depletion von Myoferlin in Brustkrebszelllinien (MDA-MB231-Zellen) zu einer verminderten Invasion dieser Zellen *in vitro* führt. Turtoi *et al.* (2013) konnten in Brustkrebszelllinien (MDA-MB468-Zellen) nach Depletion von Myoferlin eine Inhibition der Epithelialen-Mesenchymalen Transition (EMT) feststellen. Bei der Epithelialen-Mesenchymalen Transition geht eine epitheliale Zelle zu einem mesenchymalen Phänotyp mit verstärkter Invasivität und Migration über (Kalluri & Weinberg, 2009). Die EMT steht somit in Zusammenhang mit der Metastasierung von Karzinomzellen (Kalluri & Weinberg, 2009). Nach dem Ausschalten von Myoferlin in Brustkrebszelllinien (MDA-MB231-Zellen) zeigte sich eine reduzierte Migration der Zellen (Turtoi *et al.*, 2013). Volakis *et al.* (2014) beschreiben einen Zusammenhang von Myoferlin mit dem Tumorwachstum. In einem Xenograft-Modell wurden Myoferlin-depletierte Brustkrebszelllinien (MDA-MB231-Zellen) in immunsupprimierte Nacktmäuse implantiert (Volakis *et al.*, 2014). Myoferlin-depletierte Zellen bildeten dabei Tumoren signifikant verringerter Größe im Vergleich zu Kontrollzelllinien (Volakis *et al.*, 2014). Diese Beispiele aus der Literatur geben in Zusammenschau mit den Befunden der vorliegenden Arbeit wichtige Hinweise

auf die Bedeutung von Myoferlin in der Tumorigenese. In der Literatur werden verschiedene molekulare Mechanismen diskutiert, die der Tumorigenität in Abhängigkeit von Myoferlin zugrunde liegen. Nach Leung *et al.* (2013) scheint nach Myoferlin-Depletion in LLC-Zellen die Integrität von Membranen beeinträchtigt zu sein. Li *et al.* (2012) zeigen, dass durch eine Depletion von Myoferlin Matrix-Metalloproteinasen (v. a. MMP-1) beeinträchtigt werden, die für die Invasion, z. B. durch extrazelluläre Matrix, verantwortlich sind. Nach Turtoi *et al.* (2013) steht die Depletion von Myoferlin in Zusammenhang mit der Degradation des EGF-Rezeptors. Volakis *et al.* (2014) konnten zeigen, dass nach Depletion von Myoferlin in Brustkrebszelllinien (MDA-MB231-Zellen) die Adhäsion der Myoferlin-depletierten Zellen an ein Substrat verstärkt ist. Dies geht mit einer verminderten Anzahl an Aktin-Stressfasern in Myoferlin-depletierten Zellen einher (Volakis *et al.*, 2014). Blackstone *et al.* (2015) beschreiben ebenfalls eine verstärkte Zell-Substrat-Adhäsion Myoferlin-depletierter MDA-MB231-Zellen, welche ausgeprägte fokale Adhäsionen aufweisen. Dadurch, dass das Ausschalten von Myoferlin die Zell-Substrat-Adhäsion verstärkt (Blackstone *et al.*, 2015), könnte dies in den hier vorliegenden Versuchen auch die verminderte Koloniebildung auf Weichagar bewirken. Durch eine möglicherweise verstärkte Substrat-Adhäsion Myoferlin-depletierter Zellen ist bei der fehlenden Adhäsion an ein Zellkulturgefäß auf semisolidem Agarmedium kein Zellwachstum mehr möglich. Für das Zellwachstum auf Weichagar benötigen Zellen die Unabhängigkeit von Adhäsion, dies ist für transformierte Zellen charakteristisch (Pawlak & Helfman, 2001). Das beobachtete verminderte Wachstum auf Weichagar stellt einen wichtigen Befund dar, der eine Beteiligung von Myoferlin an der Tumorigenese nahelegt. Für zukünftige Therapieansätze, die auf Myoferlin abzielen könnten, ist dies ein bedeutsamer Befund.

D.5.2 Effekte der Myoferlin-Depletion auf das Zellzyklusverhalten

Um zu analysieren, ob eine Depletion von Myoferlin in HuH7-Zellen sich wie das Ausschalten von MKL1/2 auf die Zellzyklusverteilung auswirkt, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Nach MKL1/2-Depletion in HuH7-Zellen ist der Anteil an Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus erhöht (vgl. C.1.2.3, Tabelle 13, Abbildung 7). Dieser Effekt wurde mit Onkogen-induzierter Seneszenz in Zusammenhang gebracht

(Hampl *et al.*, 2013). Nach Depletion von Myoferlin zeigte sich in den hier durchgeführten ersten Experimenten bei HuH7-Zellen kein Hinweis auf eine veränderte Zellzyklusverteilung (vgl. Tabelle 16, S.63). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Wachstumsbedingungen evaluiert, um eine adäquate Zellzyklusanalyse durchführen zu können. Es sollte der Zeitpunkt sieben Tage nach lentiviraler Transduktion untersucht werden. HuH7-Kontrollzellen zeigten in Experimenten über den Zeitraum von sieben Tagen eine verstärkte Proliferation im Gegensatz zu Zellen, die einer lentivirale Transduktion mittels Myoferlin-shRNA unterzogen worden waren. Um dennoch zu gewährleisten, dass alle untersuchten Zelllinien unter gleichen Wachstumsbedingungen sieben Tage bis zur Zellernte für Zellzyklusanalysen proliferieren, wurden alle Zelllinien in gleicher Weise in sehr geringer Dichte ausgesät. Dies sollte verhindern, dass stark proliferierende HuH7-Kontrollzellen nach einer siebentägigen Wachstumsphase konfluent waren. Zellen, die konfluent sind, eignen sich nicht für die Zellzyklusanalyse durch Bestimmung des DNA-Gehalts nach Propidiumiodidapplikation (Gstraunthaler & Lindl, 2013). Die Länge der G1- und S-Phase kann in Abhängigkeit von der Zellkonzentration und Kulturbedingungen alternieren und sich dabei täglich ändern (Dean & Jett, 1974). In der Literatur finden sich in anderen Tumorentitäten unterschiedliche Befunde Myoferlin-depletierter Zellen in Bezug auf das Zellzyklusverhalten. Bei Zelllinien aus Pankreas-Adenokarzinomen zeigte sich nach Myoferlin-Depletion eine erhöhte Anzahl von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (Wang *et al.*, 2013). In einer Brustkrebszelllinie (MDA-MB-231) konnte keine Veränderung der Zellzyklusverteilung bei Myoferlin-depletierter Zellen im Vergleich zu Zellen mit Leervektor-shRNA-Transduktion sowie zu unbehandelten Kontrollzellen festgestellt werden (Li *et al.*, 2012). Es könnte sein, dass das Zellzyklusverhalten stark von der eingesetzten Zelllinie abhängig ist und je nach Tumorentität variiert.

D.5.3 Bestimmung der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase-Aktivität nach Myoferlin-Depletion

Um zu beurteilen, ob es nach Myoferlin-Knockdown zu Induktion von Seneszenz kommt, wurde die Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Aktivität bestimmt. Es zeigte sich in 3,7 % der Myoferlin-depletierten HuH7-Zellen β -Galactosidase-Aktivität. Im

Gegensatz dazu wiesen HuH7-Kontrollzellen und HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion im durchgeführten Experiment in weniger als ein Prozent Zellen mit Seneszenz-assoziiierter β -Galactosidase-Aktivität auf. Damit zeigte sich ein sehr leicht ausgeprägter Effekt auf die Seneszenzinduktion. Bei MKL1/2-depletierten HuH7-Zellen trat bei 40 % der Zellen β -Galactosidase-Aktivität auf (Hampl *et al.*, 2013). Bei weiterführenden Versuchen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich war der beobachtete Effekt auf die β -Galactosidase-Aktivität Myoferlin-depletierter Zellen stärker ausgeprägt (Hermanns *et al.*, 2017). Dies könnte durch die Bestimmung der β -Galactosidase-Aktivität an sich bedingt sein. Schon Dimri *et al.* (1995) postulierten, dass die Seneszenz-assoziierte β -Galactosidase-Aktivität kein „universeller Marker“ für Seneszenzinduktion ist. Um dennoch zu beurteilen, ob nach Myoferlin-Depletion Seneszenz eintritt, ist es sinnvoll, Signalwege wie den p53 oder den p16-pRB-Signalweg, die mit der Induktion von Seneszenz in Zusammenhang stehen (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007), zu untersuchen.

In der Literatur ist bei Brustkrebszelllinien (MDA-MB231-Zellen) beschrieben, dass Myoferlin *in vitro* zu einer moderaten Reduktion des Zellwachstums um 10-20 % führt (Turtoi *et al.*, 2013). Dies könnte im Zusammenhang damit stehen, dass der hier beobachtete Effekt geringer ist als nach Depletion von MKL1/2. Eventuell kommen zudem in unterschiedlichen Tumorentitäten unterschiedliche Mechanismen nach Myoferlin-Depletion zum Tragen. Nach Turtoi *et al.* (2013) zeigt sich nach Myoferlin-Depletion in Brustkrebszelllinien (MDA-MB231) eine verstärkte Induktion von Apoptose. Dieser Effekt war allerdings erst nach Stimulation mit EGF zu beobachten (Turtoi *et al.*, 2013). Leung *et al.* (2012) konnten in einer weiteren Studie die Induktion von Apoptose nach Depletion von Myoferlin in 16HBE-Zellen, einer SV40 transformierten humanen bronchialen epithelialen Zelllinie, feststellen. In LLC-Zellen konnte im Gegensatz dazu nach Myoferlin-Depletion keine Apoptose beobachtet werden (Leung *et al.*, 2013).

D.6 ERK-AKTIVIERUNG NACH MYOFERLIN-DEPLETION

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen der Knockdown von Myoferlin in HuH7-Zellen hat, wurden Komponenten verschiedener Signaltransduktionsprozesse mittels Western Blot untersucht. Dabei wurde das Protein ERK als Bestandteil des MAP-Kinase-Signalwegs näher untersucht. ERK wird als Bestandteil des MAP-Kinase-

Signalwegs phosphoryliert und aktiviert (Seeger & Krebs, 1995). ERK wird durch eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und Mitogene aktiviert (Seeger & Krebs, 1995). Der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg ist ein Regulationsweg für die Zellzykluskontrolle (Mordret, 1993; Wiesenauer *et al.*, 2004). In HuH7-Zellen ist eine starke Erhöhung der ERK-Phosphorylierung nach Knockdown von MKL1/2 beschrieben (Hampl *et al.*, 2013). Sieben Tage nach Depletion von Myoferlin in HuH7-Zellen konnte in ersten Versuchen eine leichte Erhöhung der Expression von phosphoryliertem ERK beobachtet werden (vgl. Abbildung 16, S. 68). Durch Quantifizierung mittels Image J konnte dies als etwa 20 %-ige Erhöhung der Myoferlin-depletierten Zellen im Vergleich zu Leervektor-shRNA-exprimierenden Zellen identifiziert werden (*Area under the curve* von 36200,149 bei HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion im Vergleich zu 43536,442 bei Myoferlin-Depletion, vgl. Tabelle 18, S. 68). In weiterführenden Versuchen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich konnte ein sehr starker Effekt auf die Expression von phosphoryliertem ERK festgestellt werden (Hermanns *et al.*, 2017). Eventuell könnte dies durch natürliche Schwankungen bedingt sein. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit steht der Befund der leichten Erhöhung der ERK-Expression in Einklang mit der nur gering ausgeprägten Zunahme der Seneszenz in Myoferlin-depletierten Zellen. In der Literatur haben Bernatchez *et al.* (2007) die Expression von phosphoryliertem ERK in BAEC-Zellen (bovine aortale Endothelzellen) nach Myoferlin-Depletion untersucht. Dabei kam es nach Myoferlin-Depletion zu geringerer ERK-Phosphorylierung als Reaktion auf VEGF-Gabe als nach VEGF-Gabe ohne gleichzeitige Myoferlin-Depletion (Bernatchez *et al.*, 2007).

D.7 VERSTÄRKTE EXPRESSION DES EGF-REZEPTORS NACH MYOFERLIN-DEPLETION

In der Literatur finden sich erste Hinweise, dass Myoferlin mit der Regulation des EGF-Rezeptors in Zusammenhang steht. Turtoi *et al.* (2013) konnten nach Depletion von Myoferlin in Brustkrebszelllinien (MDA-MB231-Zellen) eine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors feststellen. Zudem wurde nach Stimulation mit EGF eine erhöhte Expression des phosphorylierten EGF-Rezeptors beobachtet (Turtoi *et al.*, 2013). Beim hepatozellulären Karzinom ist bereits bekannt, dass in 50 % der Fälle die Signalweiterlei-

tung über den EGF-Rezeptor gestört ist (Heim *et al.*, 2015). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit analysiert, welche Effekte Myoferlin auf die EGF-Rezeptor-Expression der humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie HuH7 hat. Dabei wurde die Expression des EGF-Rezeptors zu verschiedenen Zeitpunkten nach Depletion von Myoferlin mittels lentiviraler Transduktion analysiert. Es wurden zunächst Zeitpunkte 24 und 48 Stunden nach lentiviraler Transduktion gewählt. Zudem wurden die Zeitpunkte vier und sieben Tage nach Myoferlin-Depletion untersucht. Um eine stabiles Ausschalten von Myoferlin über diese Zeiträume zu gewährleisten, wurde RNA-Interferenz mittels shRNA zur Depletion von Myoferlin eingesetzt. Damit konnte in allen untersuchten Proben eine sehr gute Effizienz der Myoferlin-Depletion erreicht werden (vgl. Abbildung 19, S. 70, Abbildung 20, S. 71, Abbildung 17, S. 68).

24 Stunden nach lentiviraler Transduktion konnte in den untersuchten Zellen keine verstärkte Expression des Gesamt-EGF-Rezeptors in Myoferlin-depletierten Zellen im Vergleich zu Leervektor-shRNA-behandelten Zellen oder HuH7-Kontrollzellen festgestellt werden (vgl. Abbildung 18, S. 70). 48 Stunden nach lentiviraler Transduktion war die Expression in Myoferlin-depletierten HuH7-Zellen im Vergleich zu HuH7-Kontrollzellen leicht erhöht (vgl. Abbildung 18, S. 70). Allerdings zeigte sich eine vergleichbare leicht erhöhte Expression in Leervektor-shRNA-behandelten Zellen. Eventuell könnte die lentivirale Transduktion an sich zu diesem Zeitpunkt Einfluss auf die Gesamtexpression des EGF-Rezeptors nehmen. Um den weiteren Zeitverlauf zu betrachten, wurden Zeitpunkte vier und sieben Tage nach lentiviraler Transduktion untersucht (vgl. Abbildung 20, S. 71; Abbildung 21, S. 71). Nach vier Tagen trat in einer Probe eine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors nach Myoferlin-Depletion im Vergleich zu HuH7-Kontrollzellen auf. Auch sieben Tage nach lentiviraler Transduktion konnte eine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors in Myoferlin-depletierten Zellen im Vergleich zu Leervektor-shRNA-exprimierenden Zellen sowie im Vergleich mit HuH7-Kontrollzellen festgestellt werden. Diese verstärkte Expression konnte in drei unabhängigen Experimenten, zurückgehend auf drei unabhängig voneinander durchgeführten lentiviralen Transduktionen, reproduziert werden (vgl. Abbildung 21). Dies lässt vermuten, dass HuH7-Zellen nach Myoferlin-Depletion in einem Zeitraum von vier bis sieben Tagen eine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors entwickeln.

Turtoi *et al.* (2013) konnten in MDA-MB-231-Brustkrebszelllinien ebenfalls eine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors nach dem Ausschalten von Myoferlin feststellen. In den Experimenten von Turtoi *et al.* (2013) war dieser Effekt schon in kürzeren Abstand zur Depletion von Myoferlin stark ausgeprägt. Bereits 48 Stunden nach dem Ausschalten von Myoferlin konnte eine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors festgestellt werden (Turtoi *et al.*, 2013). Der Unterschied zu den hier vorliegenden Daten könnte durch die unterschiedlichen untersuchten Zelllinien begründet sein. Turtoi *et al.* (2013) nehmen an, dass die erhöhte EGF-Rezeptor-Expression auf die mangelnde Degradation des EGF-Rezeptors in Myoferlin-depletierten Zellen zurückzuführen ist. EGF-Rezeptoren werden durch Endozytose und lysosomale Degradation abgebaut (Dikic, 2003). Turtoi *et al.* (2013) vermuten, dass nach Myoferlin-Depletion Caveolin-vermittelt die Degradation des EGF-Rezeptors behindert wird. In weiterführenden Versuchen zu der vorliegenden Arbeit wäre es interessant, beispielsweise mit Rasterkraftexperimenten zu untersuchen, ob der Mechanismus der Caveolin-abhängigen Regulation des EGF-Rezeptors nach Myoferlin-Depletion auch in HuH7-Zellen zum Tragen kommt.

Bei HuH7-Zellen ist in der Literatur bereits eine Überexpression des EGF-Rezeptors beschrieben (Poojari *et al.*, 2015). Die EGF-Rezeptor-Überexpression in HCC-Tumoren geht mit Aggressivität des Tumors und schlechter Prognose einher (Poojari *et al.*, 2015). Interessant ist, dass die hier untersuchten Myoferlin-depletierten Zellen im Gegensatz dazu, trotz verstärkter Expression des Gesamt-EGF-Rezeptors, sieben Tage nach Myoferlin-Depletion mit signifikant verringertem Wachstum auf Weichagar (vgl. Abbildung 10, Abbildung 11) eher einen Phänotyp aufwiesen, der mit geringerer tumorigener Aktivität assoziiert ist. Daher wurde zusätzlich der Aktivierungsstatus des Rezeptors untersucht. Um zu überprüfen, ob der EGF-Rezeptor sieben Tage nach Myoferlin-Depletion in der aktivierten Form vorliegt, wurden Westernblot-Analysen zur Detektion des Phosphorylierungsstatus durchgeführt. Die Phosphorylierung wird durch Bindung des Liganden EGF ausgelöst und führt zur Aktivierung des Rezeptors (Breuhahn *et al.*, 2006; Schoeberl *et al.*, 2002). Dies geht mit der Induktion von Signalkaskaden einher (Breuhahn *et al.*, 2006). Bei der Überprüfung des Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors zeigte sich keine verstärkte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors vier Tage nach Myoferlin-Depletion (vgl. Abbildung 20). Sieben Tage nach dem Ausschalten von

Myoferlin war eine verstärkte Phosphorylierung im Vergleich zu HuH7-Kontrollzellen aufgetreten, die aber vergleichbar stark ausgeprägt war wie die Phosphorylierung bei HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion (vgl. Abbildung 21). Für diese Versuche wurde analog den Experimenten von Turtoi *et al.* (2013) die Phosphorylierung an Tyrosin 1173 untersucht. Diese Phosphorylierungsstelle stellt die am stärksten und am schnellsten phosphorylierte Stelle am EGF-Rezeptor dar (Downward *et al.*, 1985; Monteiro *et al.*, 2014). Im Gegensatz zu den von Turtoi *et al.* (2013) durchgeführten Versuchen an Brustkrebszelllinien zeigte sich keine verstärkte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors an Tyrosin 1173 im Vergleich zu Zellen mit Leervektor-Transduktion in Proben, die eine verstärkte Expression des Gesamt-EGF-Rezeptors aufwiesen. Die Diskrepanz könnte dadurch begründet sein, dass von Turtoi *et al.* (2013) der Zeitpunkt 48 Stunden nach Myoferlin-Depletion untersucht wurde. Im Gegensatz dazu wurde bei den vorliegenden Ergebnissen die verstärkte Expression des EGF-Rezeptors erst vier bzw. sieben Tage nach Myoferlin-Depletion beobachtet sowie die Phosphorylierung untersucht. Möglicherweise liegt in Brustkrebszelllinien eine andere Kinetik vor. Es könnte außerdem möglich sein, dass zu dem Zeitpunkt vier bzw. sieben Tage nach lentiviraler Transduktion die Phosphorylierung bereits nicht mehr vorhanden ist. Daten aus der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich zeigen, dass der EGF-Rezeptor in HuH7-Zellen 24 Stunden nach Myoferlin-Depletion verstärkt phosphoryliert vorliegt (Hampl, 2014; Hermanns *et al.*, 2017). Es wäre hier interessant, den genauen Zeitverlauf in Hinblick auf Rezeptorexpression und Phosphorylierungsstatus im Zeitraum von 24 Stunden bis sieben Tage nach lentiviraler Transduktion in weiterführenden Arbeiten zu untersuchen. Des Weiteren wurden die Experimente von Turtoi *et al.* (2013) im Gegensatz zu den hier aufgeführten Experimenten unter Stimulation mit EGF durchgeführt, welches als Ligand den EGF-Rezeptor bindet und dadurch die Phosphorylierung einleitet (Schoeberl *et al.*, 2002). Durch die mangelnde Aktivierung via EGF könnte der Rezeptor in geringerem Umfang phosphoryliert vorliegen.

Es gibt in der Literatur bereits mehrere Hinweise, die belegen, dass Myoferlin an der Regulation verschiedener Rezeptoren beteiligt ist. Dabei sind verschiedene Auswirkungen einer Myoferlin-Depletion in unterschiedlichen Modellsystemen und Rezeptoren beschreiben. Eisenberg *et al.* (2011) konnten eine verminderte Phosphorylierung verschiedener Rezeptoren (JAK2, IGFR-1 u.a.) in Myoferlin-depletierten Zellen (MDA-

MB231-Zellen) feststellen. Myoferlin scheint in murinen Muskelzellen an der Signaltransduktion via IGF (insulin-like-growth-factor) über den IGF-Rezeptor (IGFR) beteiligt zu sein (Demonbreun *et al.*, 2010b). Nach Myoferlin-Depletion bei Mäusen sind Muskelzellen nicht mehr in der Lage, auf IGF1 zu reagieren, allerdings ist in diesen Zellen die IGFR-Expression nicht verändert (Demonbreun *et al.*, 2010b). In BAEC-Zellen (bovine aortale Endothel-Zellen) wird durch Ausschalten von Myoferlin die Expression und Phosphorylierung des VEGF-Rezeptors 2 nach VEGF-Gabe reduziert (Bernatchez *et al.*, 2007). Bernatchez *et al.* (2007) führen dies auf eine vermehrte Polyubiquitylierung des VEGF-Rezeptors 2 zurück, die vermutlich zur Degradation des Rezeptors führt. Turtoi *et al.* (2013) führen im Gegensatz dazu die verstärkte Expression des EGF-Rezeptors nach Myoferlin-Depletion darauf zurück, dass ohne Myoferlin die Degradation des EGF-Rezeptors vermindert ist. Der genaue Mechanismus, der der verstärkten EGF-Rezeptor-Expression in Myoferlin-depletierten HuH7-Zellen zugrunde liegt, ist der Gegenstand weiterführender Arbeiten.

D.8 REKONSTITUTION

Mikroarray-Analysen der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich (Hermanns *et al.*, 2017) sowie aus den Daten der vorliegenden Promotionsarbeit (vgl. Abbildung 15) deuten darauf hin, dass die Myoferlin-Expression von MKL1 abhängig ist. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte einer verstärkten Expression des EGF-Rezeptors nach Myoferlin-Depletion abhängig von MKL1 sind, wurden Rekonstitutionsexperimente durchgeführt. Dafür wurden HuH7-Zellen Myoferlin mithilfe von Lipofectamine® 2000 mit einem Myoferlin-enthaltenden Plasmid transfiziert, um so eine Überexpression von Myoferlin zu erreichen. Zusätzlich wurde durch RNA-Interferenz mittels shRNA und lentiviraler Transduktion eine stabile MKL1/2-Depletion in den Myoferlin-überexprimierenden HuH7-Zellen eingebracht. Als Kontrollzellen wurden Myoferlin-überexprimierende HuH7-Zellen einer lentiviralen Transduktion mit Leervektor-shRNA unterzogen. Als weitere Kontrollzellen wurden HuH7-Zellen, die lediglich eine MKL1/2-Depletion mittels shRNA aufwiesen, sowie unbehandelte HuH7-Zellen eingesetzt. Bei Depletion von MKL1/2 in HuH7-Zellen würde demnach ein ähnlicher Effekt

wie nach Myoferlin-Depletion erwartet. Bei gleichzeitigem Einbringen einer durch Lipofectamin® 2000 erzielten verstärkten Expression von Myoferlin wäre zu erwarten, dass dieser Effekt reversibel ist. Nach Zeitpunkten von 24 und 48 Stunden nach lentiviraler Transduktion wurden die Zellen für Western-Blot-Analysen geerntet. Die durchgeführte lentivirale Transduktion erreichte einen guten Knockdown von MKL1; ebenso erzielte die durchgeführte transiente Transfektion von Myoferlin gute Ergebnisse (vgl. Abbildung 22, S. 73, Abbildung 23, S. 74). 24 Stunden nach lentiviraler Transduktion von MKL1/2-shRNA bzw. Leervektor-shRNA und 48 Stunden nach transienter Transfektion von Myoferlin zeigte sich keine veränderte Expression des EGF-Rezeptors. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen bei Depletion von Myoferlin. Hier wurde ebenfalls keine verstärkte Expression des EGF-Rezeptors nach 24 Stunden beobachtet. Nach 48 Stunden zeigte sich eine allenfalls leicht erhöhte Expression des EGF-Rezeptors nach Myoferlin-Überexpression bei stabiler Depletion von MKL1/2. Hier wäre es interessant, den Effekt nach einem längeren Zeitraum als 48 Stunden zu beobachten. Es wurden in den hier durchgeführten ersten Experimenten lediglich die Zeitpunkte 24 und 48 Stunden nach lentiviraler Transduktion von MKL1/2-shRNA bzw. Leervektor-shRNA beurteilt. Dies wurde so gewählt, da eventuell eine Transfektion mittels Lipofectamine® 2000 und anschließende lentivirale Transduktion einen zu starken toxischen Effekt auf Zellen ausüben könnte, der keine adäquate Beurteilung über einen längeren Zeitraum zulässt. Hier wären in künftigen Studien methodische Optimierungen nötig, um zu gewährleisten, dass eine erhöhte Zelltoxizität nach dem Zeitraum von sieben Tagen ausgeschlossen werden kann. Zu diesem Zeitpunkt war die verstärkte Expression des EGF-Rezeptors in HuH7-Zellen eingetreten (vgl. Abbildung 21).

Die Expression von ERK wurde 48 Stunden nach lentiviraler Transduktion analysiert. In der Expression des gesamten ERK-Proteins zeigte sich kein Unterschied zwischen Myoferlin-überexprimierenden MKL1-depletierten Zellen und den untersuchten Kontrollzelllinien. Bei der Expression des phosphorylierten ERK-Proteins zeigten Myoferlin-überexprimierende MKL1-depletierte Zellen eine leichte Erhöhung der Expression im Vergleich zu den untersuchten Kontrollzelllinien. Eventuell bewirkt die Myoferlin-Überexpression in diesen Zellen eine verstärkte Phosphorylierung von ERK. In den hier untersuchten MKL1-depletierten Zellen zeigte sich keine gesteigerte phospho-ERK-

Expression in den aufgeführten Untersuchungen. Bei Hampl *et al.* (2013) ist eine verstärkte Phosphorylierung MKL1/2-depletierter Zellen im Rahmen des Auftretens von Onkogen-induzierter Seneszenz beschrieben. Diese Diskrepanz könnte auch dadurch bedingt sein, dass nur ein Zeitraum relativ kurz nach lentiviraler Transduktion untersucht wurde. Nach MKL1/2-Depletion ist eine starke Verminderung der Proliferation im Rahmen der Onkogen-induzierten Seneszenz beschrieben (Hampl *et al.*, 2013). 48 Stunden nach Depletion von MKL1/2 war dieser Effekt auf das Zellwachstum noch nicht sehr stark ausgeprägt (Hampl *et al.*, 2013). Dies könnte daher mit der hier beobachteten fehlenden verstärkten Expression des phosphorylierten ERK in Zusammenhang stehen.

D.9 ÜBERSICHT AUSWIRKUNG DER MYOFERLIN- DEPLETION AUF HUH7-ZELLEN UND AUSBLICK

Insgesamt gesehen zeigt sich ein vielschichtiges Bild der Auswirkungen einer Myoferlin-Depletion im Zusammenhang mit den Effekten der transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2 auf hepatozelluläre Tumorzelllinien. Nach Myoferlin-Depletion konnte in ersten Versuchen ein Zellzyklusprofil vergleichbar mit den untersuchten Kontrollzelllinien gemessen werden. Es konnte in ersten Experimenten ein leichter Effekt auf die β -Galactosidase-Aktivität im Rahmen Onkogen-induzierter Seneszenz festgestellt werden sowie eine leichte Induktion der Phosphorylierung von ERK beobachtet werden. Besonders interessant ist die hoch signifikant verminderte Koloniebildung Myoferlin-depletierter Zellen auf semisolidem Agarmedium. Die Myoferlin-Depletion geht mit einer gesteigerten Expression des EGF-Rezeptors sieben Tage nach dem Ausschalten von Myoferlin einher. Die beobachtete leichte Erhöhung der phospho-ERK-Expression könnte mit der erhöhten Expression des EGF-Rezeptors in Zusammenhang stehen, nachdem ERK ein Teil des EGF-Rezeptor-Signalweges ist (Schoeberl *et al.*, 2002). Eventuell könnte der Befund der leicht erhöhten phosphorylierten ERK-Expression bei stark erhöhter Expression des EGF-Rezeptors mit der nicht verstärkt ausgebildeten Phosphorylierung des Rezeptors in Zusammenhang stehen.

Das signifikant verminderte Wachstum Myoferlin-depletierter Zellen auf Weichagar stellt in Verbindung mit der verstärkten Expression des EGF-Rezeptors einen interes-

santen Befund dar, da die Koloniebildung auf Softagar ein *in vitro*-Marker eines „malignen Phänotyps“ darstellt (Heim *et al.*, 2015). Nach Eisenberg *et al.* (2011) könnte Myoferlin in Zukunft eventuell als ein Biomarker der Metastasierung in Frage kommen. Möglicherweise könnte eine solche Einsatzmöglichkeit auch beim hepatozellulären Karzinom Bedeutung erlangen. Myoferlin wird in der Literatur bereits als interessantes Ziel in Hinblick auf zukünftige Krebstherapien beschrieben (Eisenberg *et al.*, 2011). Der Befund der verstärkten Expression des EGF-Rezeptors nach Myoferlin-Depletion stellt ebenfalls ein wichtiges Ergebnis für zukünftige Therapieoptionen dar. Molekulare Therapien am EGF-Rezeptor setzen an der intrazellulären Tyrosinkinaseaktivität an oder inhibieren die Bindung von Liganden an den EGF-Rezeptor (Germano & Daniele, 2014). Solche Inhibitoren, die am EGF-Rezeptor ansetzten, zeigten jedoch bislang mit Ausnahme einer geringen Aktivität von Erlotinib keine Wirkung bei fortgeschrittenen hepatozellulären Karzinomen (Germano & Daniele, 2014). Insbesondere ein Zusammenhang mit einer Seneszenz-Induktion, ähnlich der beobachteten Effekte bei MKL1/2-Depletion (Hampl *et al.*, 2013; Hermanns *et al.*, 2017), macht Myoferlin zu einer interessanten Zielstruktur für zukünftige Therapien. Die Befunde der vorliegenden Arbeit tragen somit dazu bei, Myoferlin als MKL1/2-abhängiges Zielgen in hepatozellulären Karzinomzellen im Hinblick auf die Regulation der Proliferation besser zu verstehen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Hepatozelluläre Karzinome sind Krebserkrankungen mit schlechter Prognose und eingeschränkten kurativen Therapiemöglichkeiten (Germano & Daniele, 2014). DLC1 konnte als häufig in hepatozellulären Karzinomen deletierter Tumorsuppressor identifiziert werden (Ng *et al.*, 2000; Xue *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 1998). Nach Verlust von DLC1 sind die transkriptionellen Koaktivatoren MKL1/2 in hepatozellulären Karzinomzellen konstitutiv nukleär lokalisiert (Mühlich *et al.*, 2012). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von DLC1 sowie MKL1/2 auf das Wachstumsverhalten hepatozellulärer Karzinomzellen näher charakterisiert. Dabei wurde sowohl die DLC1-exprimierende Hepatoblastom-Zelllinie HepG2 als auch die hepatozelluläre Karzinomzelllinie HuH7 untersucht, die keine DLC1-Expression aufweist (Mühlich *et al.*, 2012). Nach Ausschalten des Tumorsuppressors DLC1 in der Hepatoblastomlinie HepG2 konnte ein vermehrtes autonomes Zellwachstum auf Weichagar im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Um den Zellzyklus von HepG2 und HuH7-Zellen in Abhängigkeit von DLC1 und MKL1/2 zu untersuchen, wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Dabei konnte eine Arretierung in der G1-Phase nach Ausschalten von MKL1/2 in DLC1-defizienten hepatozellulären Karzinomzellen festgestellt werden. Dies war ein wegweisender Befund; der Proliferationsstopp konnte in Folgeexperimenten der Onkogen-induzierten Seneszenz zugeordnet werden (Hampl *et al.*, 2013). In weiterführenden Arbeiten wurde Myoferlin als Zielgen identifiziert, das die Onkogen-induzierte Seneszenz nach MKL1/2-Depletion in DLC1-defizienten hepatozellulären Karzinomzellen vermittelt (Hermanns *et al.*, 2017). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ein stabiler Myoferlin-Knockdown in HuH7-Zellen eingebracht. Mittels dieser Zelllinie konnte nachgewiesen werden, dass eine Depletion von Myoferlin das autonome Zellwachstum auf Weichagar hoch signifikant vermindert. Des Weiteren konnte eine vermehrte Expression des EGF-Rezeptors in Myoferlin-depletierten Zellen nachgewiesen werden. Durch diese Befunde wird Myoferlin als interessante Zielstruktur zukünftiger Therapieoptionen näher charakterisiert. Die vorliegende Arbeit leistet damit einen wichtigen Beitrag, die MKL1/2-abhängige Tumorigenese in hepatozellulären Karzinomzellen besser zu verstehen und die Auswirkungen von Myoferlin auf Proliferationskontrolle und assoziierte Signalproteine aufzudecken.

F. ANHANG

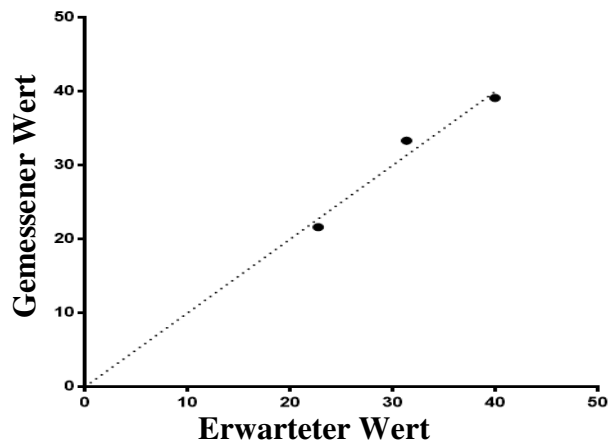


Abbildung 24. QQ-Plot HepG2-Zellen für Zellzyklusanalysen (Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, vgl. Abschnitt C.1.2.1)

Y-Achse: gemessene Werte, X-Achse: erwartete Werte bei Normalverteilung

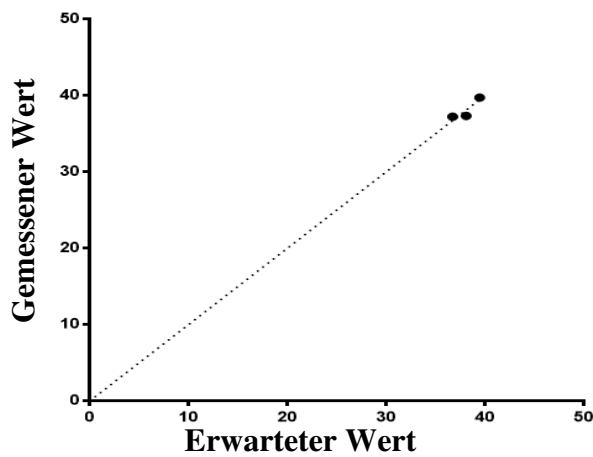


Abbildung 25. QQ-Plot HepG2-DLC1-KD-Zellen für Zellzyklusanalysen (Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, vgl. Abschnitt C.1.2.1)

Y-Achse: gemessene Werte, X-Achse: erwartete Werte bei Normalverteilung

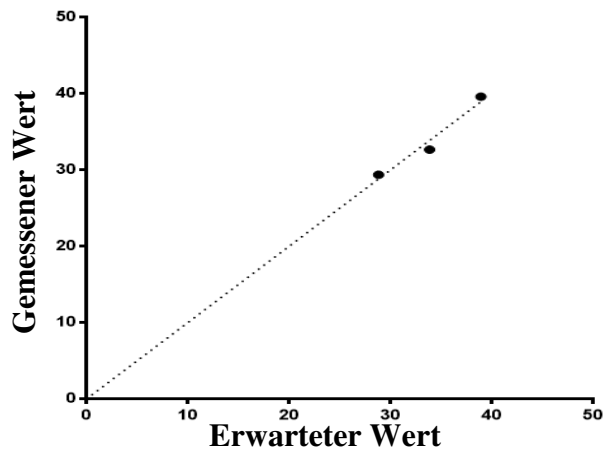


Abbildung 26. QQ-Plot HepG2-Zellen für Zellzyklusanalysen (Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, vgl. Abschnitt C.1.2.2)

Y-Achse: gemessene Werte, X-Achse: erwartete Werte bei Normalverteilung

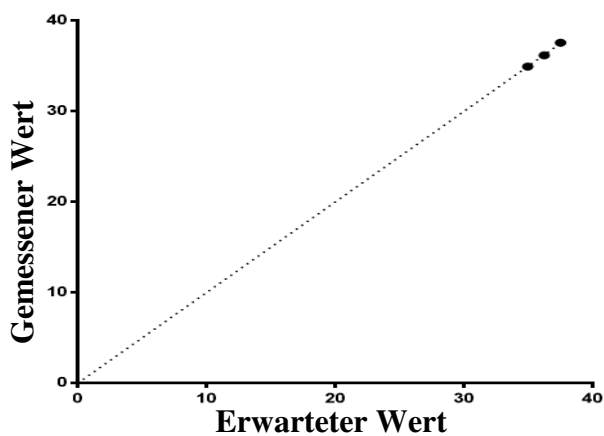


Abbildung 27. QQ-Plot HepG2-MKL1/2-KD-Zellen für Zellzyklusanalysen (Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, vgl. Abschnitt C.1.2.2)

Y-Achse: gemessene Werte, X-Achse: erwartete Werte bei Normalverteilung

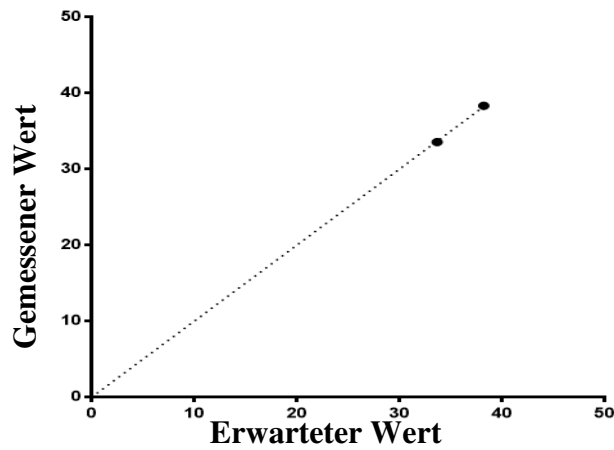


Abbildung 28. QQ-Plot HuH7-Zellen für Zellzyklusanalysen (Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus, vgl. Abschnitt C.1.2.3)

Y-Achse: gemessene Werte, X-Achse: erwartete Werte bei Normalverteilung

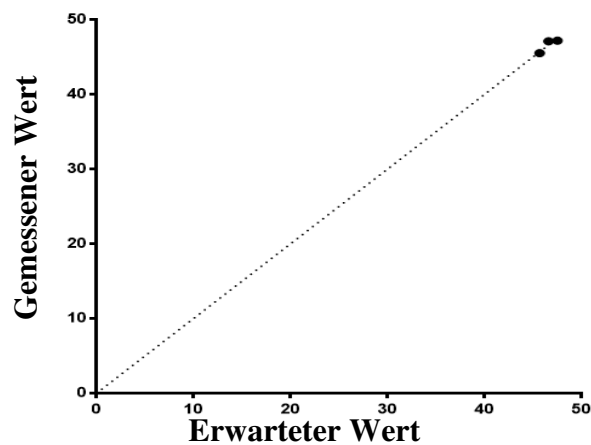


Abbildung 29. QQ-Plot HuH7-MKL1/2-KD-Zellen für Zellzyklusanalysen (vgl. Abschnitt C.1.2.3)

Y-Achse: gemessene Werte, X-Achse: erwartete Werte bei Normalverteilung

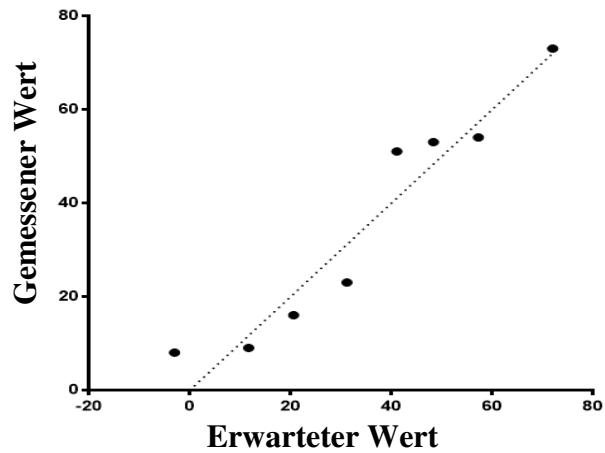


Abbildung 30. QQ-Plot HuH7-Zellen nach Leervektor-Transduktion für Weichagaranalysen bei 20.000 ausgesäten Zellen (vgl. Abschnitt C.2.1, Abbildung 10)

Y-Achse: gemessene Werte, X-Achse: erwartete Werte bei Normalverteilung.

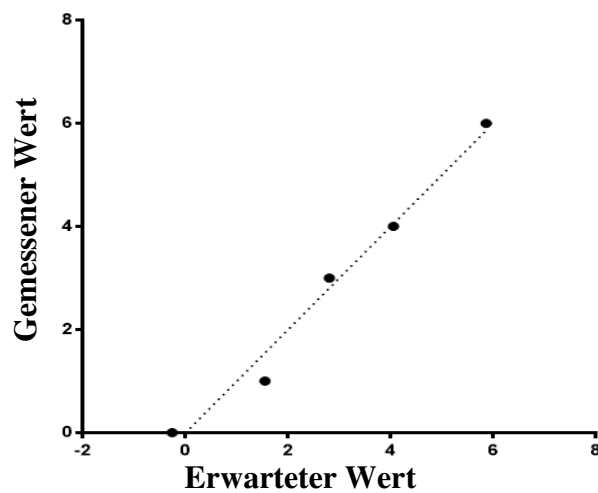


Abbildung 31. QQ-Plot Myoferlin-depletierte HuH7-Zellen nach Leervektor-Transduktion für Weichagaranalysen bei 20.000 ausgesäten Zellen (vgl. Abschnitt C.2.1, Abbildung 10)

Y-Achse: gemessene Werte, X-Achse: erwartete Werte bei Normalverteilung

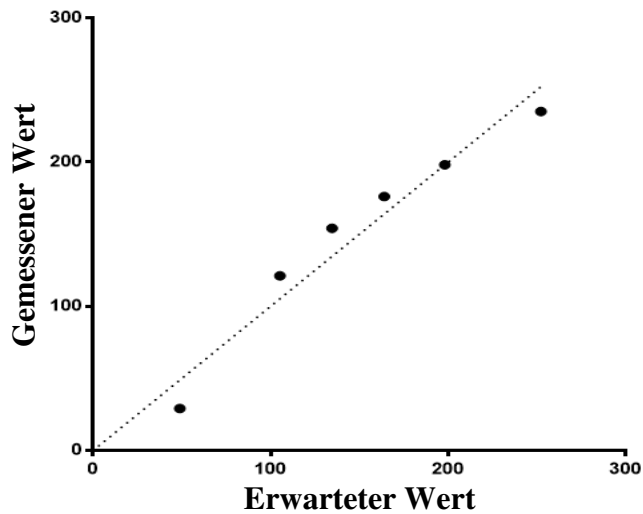


Abbildung 32. QQ-Plot HuH7-Zellen mit Leervektor-Transduktion für Weichagaranalysen bei 40.000 ausgesäten Zellen (vgl. Abschnitt C.2.1, Abbildung 11)

Y-Achse: gemessene Werte, X-Achse: erwartete Werte bei Normalverteilung

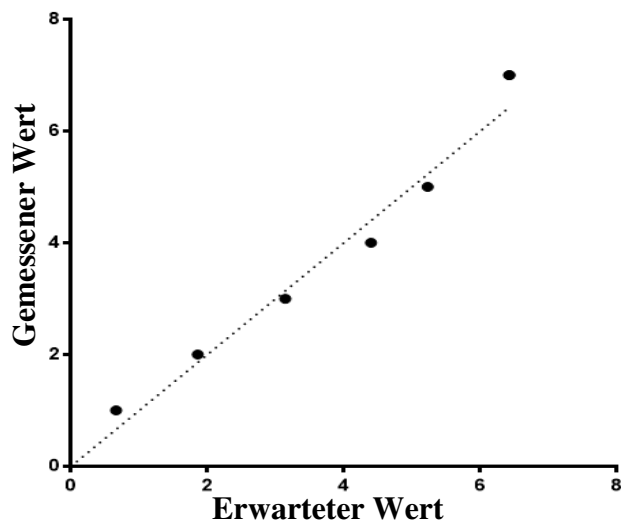


Abbildung 33. QQ-Plot Myoferlin-depletierte HuH7-Zellen für Weichagaranalysen bei 40.000 ausgesäten Zellen (vgl. Abschnitt C.2.1, Abbildung 11)

Y-Achse: gemessene Werte, X-Achse: erwartete Werte bei Normalverteilung

LITERATURVERZEICHNIS

Allsopp, R.C. & Harley, C.B. 1995. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Experimental cell research* **219**(1): 130-136

Baarlink, C., Wang, H. & Grosse, R. 2013. Nuclear actin network assembly by formins regulates the SRF coactivator MAL. *Science (New York, NY)* **340**(6134): 864-867

Bade, S., Röckendorf, N., Frey, A. & Petersen, A. (2012) Western Blotting. In: Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Jansohn M&Rothhämel S (Herausgeber), 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 978-3-8274-2429-7

Bader, F.G., Auer, G., Roblick, U.J., Bruch, H.-P. & Habermann, J.K. (2010) Histopathologie, Tumorklassifikationen und Prognosefaktoren. In: Hepatobiliäre und Pankreastumoren. Birth M, Ittel TH&Pereira PL (Herausgeber), 1. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH 978-3-642-04934-7

Bernatchez, P.N., Acevedo, L., Fernandez-Hernando, C., Murata, T., Chalouni, C., Kim, J., Erdjument-Bromage, H., Shah, V., Gratton, J.P., McNally, E.M., Tempst, P. & Sessa, W.C. 2007. Myoferlin regulates vascular endothelial growth factor receptor-2 stability and function. *The Journal of biological chemistry* **282**(42): 30745-30753

Bernatchez, P.N., Sharma, A., Kodaman, P. & Sessa, W.C. 2009. Myoferlin is critical for endocytosis in endothelial cells. *American journal of physiology Cell physiology* **297**(3): C484-C492

Blackstone, B.N., Li, R., Ackerman, W.E.t., Ghadiali, S.N., Powell, H.M. & Kniss, D.A. 2015. Myoferlin depletion elevates focal adhesion kinase and paxillin phosphorylation and enhances cell-matrix adhesion in breast cancer cells. *American journal of physiology Cell physiology* **308**(8): C642-C649

Böck, G., Steinlein, P. & Huber, L.A. 1997. Cell biologists sort things out: Analysis and purification of intracellular organelles by flow cytometry. *Trends in cell biology* **7**(12): 499-503

Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M.K., Tauler, J., Bikkavilli, R.K. & Winn, R.A. 2014. The soft agar colony formation assay. *Journal of visualized experiments : JoVE*(92): e51998

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254
- Breuhahn, K., Longerich, T. & Schirmacher, P. 2006. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **25**(27): 3787-3800
- Bubendorf, L., Feichter, G.E., Obermann, E.C. & Dalquen, P. (2011) Zytopathologie. In: Pathologie. Klöppel G, Kreipe HH&Remmele W (Herausgeber), 3. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag 978-3-642-04561-5
- Burnette, W.N. 1981. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical biochemistry* **112**(2): 195-203
- Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**(9): 729-740
- Cen, B., Selvaraj, A., Burgess, R.C., Hitzler, J.K., Ma, Z., Morris, S.W. & Prywes, R. 2003. Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Molecular and cellular biology* **23**(18): 6597-6608
- Cen, B., Selvaraj, A. & Prywes, R. 2004. Myocardin/MKL family of SRF coactivators: key regulators of immediate early and muscle specific gene expression. *Journal of cellular biochemistry* **93**(1): 74-82
- Cifone, M.A. 1982. In vitro growth characteristics associated with benign and metastatic variants of tumor cells. *Cancer metastasis reviews* **1**(4): 335-347
- Cohen, M.H., Johnson, J.R., Chen, Y.F., Sridhara, R. & Pazdur, R. 2005. FDA drug approval summary: erlotinib (Tarceva) tablets. *The oncologist* **10**(7): 461-466
- Cohen, M.H., Williams, G.A., Sridhara, R., Chen, G. & Pazdur, R. 2003. FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets. *The oncologist* **8**(4): 303-306
- Conklin, D.S. 2003. RNA-interference-based silencing of mammalian gene expression. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **4**(10): 1033-1039
- Courtois-Cox, S., Jones, S.L. & Cichowski, K. 2008. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* **27**(20): 2801-2809

- Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Price, P.J. & Ciccarone, V.C. 2004. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods (San Diego, Calif)* **33**(2): 95-103
- Darken, M.A. 1964. Puromycin inhibition of protein synthesis. *Pharmacological reviews* **16**: 223-243
- Davis, D.B., Delmonte, A.J., Ly, C.T. & McNally, E.M. 2000. Myoferlin, a candidate gene and potential modifier of muscular dystrophy. *Human molecular genetics* **9**(2): 217-226
- Davis, D.B., Doherty, K.R., Delmonte, A.J. & McNally, E.M. 2002. Calcium-sensitive phospholipid binding properties of normal and mutant ferlin C2 domains. *The Journal of biological chemistry* **277**(25): 22883-22888
- Davis, H.E., Rosinski, M., Morgan, J.R. & Yarmush, M.L. 2004. Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophysical journal* **86**(2): 1234-1242
- Dean, P.N. & Jett, J.H. 1974. Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. *J Cell Biol* **60**(2): 523-527
- Dechert, U. (2012) Gelelektrophoresen. In: Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Jansohn M&Rothhämel S (Herausgeber), 5. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 978-3-8274-2429-7
- Demonbreun, A.R., Lapidos, K.A., Heretis, K., Levin, S., Dale, R., Pytel, P., Svensson, E.C. & McNally, E.M. 2010a. Myoferlin regulation by NFAT in muscle injury, regeneration and repair. *Journal of cell science* **123**(Pt 14): 2413-2422
- Demonbreun, A.R., Posey, A.D., Heretis, K., Swaggart, K.A., Earley, J.U., Pytel, P. & McNally, E.M. 2010b. Myoferlin is required for insulin-like growth factor response and muscle growth. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **24**(4): 1284-1295
- Dikic, I. 2003. Mechanisms controlling EGF receptor endocytosis and degradation. *Biochemical Society transactions* **31**(Pt 6): 1178-1181
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. & et al. 1995. A biomarker that identifies

senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(20): 9363-9367

Downward, J., Waterfield, M.D. & Parker, P.J. 1985. Autophosphorylation and protein kinase C phosphorylation of the epidermal growth factor receptor. Effect on tyrosine kinase activity and ligand binding affinity. *The Journal of biological chemistry* **260**(27): 14538-14546

Eisenberg, M.C., Kim, Y., Li, R., Ackerman, W.E., Kniss, D.A. & Friedman, A. 2011. Mechanistic modeling of the effects of myoferlin on tumor cell invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(50): 20078-20083

Eslami, A. & Lujan, J. 2010. Western blotting: sample preparation to detection. *Journal of visualized experiments : JoVE*(44)

Etienne-Manneville, S. & Hall, A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**(6916): 629-635

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669): 806-811

García-Vilas, J.A., Quesada, A.R. & Medina, M.A. 2015. Damnacanthal, a noni anthraquinone, inhibits c-Met and is a potent antitumor compound against Hep G2 human hepatocellular carcinoma cells. *Scientific reports* **5**: 8021

Germano, D. & Daniele, B. 2014. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. *World journal of gastroenterology* **20**(12): 3087-3099

Ghasemi, A. & Zahediasl, S. 2012. Normality tests for statistical analysis: a guide for non-statisticians. *International journal of endocrinology and metabolism* **10**(2): 486-489

Graham, F.L. & van der Eb, A.J. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**(2): 456-467

Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* **36**(1): 59-74

- Greer, S., Honeywell, R., Geletu, M., Arulanandam, R. & Raptis, L. 2010. Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells. *Journal of immunological methods* **355**(1-2): 76-79
- Grise, F., Bidaud, A. & Moreau, V. 2009. Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochimica et biophysica acta* **1795**(2): 137-151
- Gstraunthaler, G. & Lindl, T. (2013) Zell- und Gewebekultur; Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen, 7. Auflage. Berlin Heidelberg: Springer- Verlag
- Hall, A. 1998. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science (New York, NY)* **279**(5350): 509-514
- Hampl, V. Role of the transcriptional coactivators Megakaryoblastic Leukemia Proteins 1 and 2 in tumorigenesis. Dissertation, LMU München, München, 2014
- Hampl, V., Martin, C., Aigner, A., Hoebel, S., Singer, S., Frank, N., Sarikas, A., Ebert, O., Prywes, R., Gudermann, T. & Muehlich, S. 2013. Depletion of the transcriptional coactivators megakaryoblastic leukaemia 1 and 2 abolishes hepatocellular carcinoma xenograft growth by inducing oncogene-induced senescence. *EMBO molecular medicine* **5**(9): 1367-1382
- Hart, A. 2001. Mann-Whitney test is not just a test of medians: differences in spread can be important. *BMJ (Clinical research ed)* **323**(7309): 391-393
- Healy, K.D., Hodgson, L., Kim, T.Y., Shutes, A., Maddileti, S., Juliano, R.L., Hahn, K.M., Harden, T.K., Bang, Y.J. & Der, C.J. 2008. DLC-1 suppresses non-small cell lung cancer growth and invasion by RhoGAP-dependent and independent mechanisms. *Molecular carcinogenesis* **47**(5): 326-337
- Heim, D., Cornils, K., Schulze, K., Fehse, B., Lohse, A.W., Brummendorf, T.H. & Wege, H. 2015. Retroviral insertional mutagenesis in telomerase-immortalized hepatocytes identifies RIPK4 as novel tumor suppressor in human hepatocarcinogenesis. *Oncogene* **34**(3): 385-393
- Henderson, A.R. 2006. Testing experimental data for univariate normality. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* **366**(1-2): 112-129
- Hermanns, C., Hampl, V., Holzer, K., Aigner, A., Penkava, J., Frank, N., Martin, D.E., Maier, K.C., Waldburger, N., Roessler, S., Goppelt-Strube, M., Akrap, I., Thavamani, A., Singer, S., Nordheim, A., Gudermann, T. & Muehlich, S. 2017. The novel MKL

target gene myoferlin modulates expansion and senescence of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **36**(24): 3464-3476

Herold, G. (2012) Innere Medizin 2013. Köln: Herold, Gerd 978-3-9814660-2-7

Holstege, A., Pausch, J. & Rösch, W. (2013) Leber, Galle, Pankreas. In: Duale Reihe Innere Medizin. Bob A&Bob K (Herausgeber), 3., überarb. Auflage, S: 634-635. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 978-3-13-118163-3

Hüsler, J. & Zimmermann, H. (2006) Statistische Prinzipien für medizinische Projekte, 4., vollst. überarb. und erw. Auflage. Bern: Verlag Hans Huber 3-456-84233-3

Jin, Y., Tian, X., Shang, Y. & Huang, P. 2008. Inhibition of DLC-1 gene expression by RNA interference in the colon cancer LoVo cell line. *Oncology reports* **19**(3): 669-674

Jordan, M., Schallhorn, A. & Wurm, F.M. 1996. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. *Nucleic Acids Res* **24**(4): 596-601

Kalluri, R. & Weinberg, R.A. 2009. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* **119**(6): 1420-1428

Kellner, U. (2013) Hepatobiliäres System. In: Kurzlehrbuch Pathologie. Krams M, Frahm SO&Mawrin C (Herausgeber), 2., aktualisierte Auflage, S. 285 ff. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG 978-3-13-143252-0

Krishan, A. 1975. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* **66**(1): 188-193

Lancaster, C.A., Taylor-Harris, P.M., Self, A.J., Brill, S., van Erp, H.E. & Hall, A. 1994. Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *The Journal of biological chemistry* **269**(2): 1137-1142

Larsson, L.G. 2011. Oncogene- and tumor suppressor gene-mediated suppression of cellular senescence. *Semin Cancer Biol* **21**(6): 367-376

Lee, S.M., Vasishtha, M. & Prywes, R. 2010. Activation and repression of cellular immediate early genes by serum response factor cofactors. *The Journal of biological chemistry* **285**(29): 22036-22049

Leitlinienprogramm, O. (2013) Diagnostik und Therapie des hepatozellulären Karzinoms, Langversion 1.0 Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF Leitlinienprogramm Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. 3.9.2015 http://leitlinienprogramm-onkologie.de/uploads/tx_sbdownloader/S3-HCC-OL-Langversion-V1.0.pdf

Leung, C., Shaheen, F., Bernatchez, P. & Hackett, T.L. 2012. Expression of myoferlin in human airway epithelium and its role in cell adhesion and zonula occludens-1 expression. *PloS one* **7**(7): e40478

Leung, C., Yu, C., Lin, M.I., Tognon, C. & Bernatchez, P. 2013. Expression of myoferlin in human and murine carcinoma tumors: role in membrane repair, cell proliferation, and tumorigenesis. *The American journal of pathology* **182**(5): 1900-1909

Li, R., Ackerman, W.E.t., Mihai, C., Volakis, L.I., Ghadiali, S. & Kniss, D.A. 2012. Myoferlin depletion in breast cancer cells promotes mesenchymal to epithelial shape change and stalls invasion. *PloS one* **7**(6): e39766

Llovet, J.M., Di Bisceglie, A.M., Bruix, J., Kramer, B.S., Lencioni, R., Zhu, A.X., Sherman, M., Schwartz, M., Lotze, M., Talwalkar, J. & Gores, G.J. 2008. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **100**(10): 698-711

Llovet, J.M., Fuster, J. & Bruix, J. 2004. The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society* **10**(2 Suppl 1): S115-120

López-Terrada, D., Cheung, S.W., Finegold, M.J. & Knowles, B.B. 2009. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Human pathology* **40**(10): 1512-1515

Ma, Z., Morris, S.W., Valentine, V., Li, M., Herbrick, J.A., Cui, X., Bouman, D., Li, Y., Mehta, P.K., Nizetic, D., Kaneko, Y., Chan, G.C., Chan, L.C., Squire, J., Scherer, S.W. & Hitzler, J.K. 2001. Fusion of two novel genes, RBM15 and MKL1, in the t(1;22)(p13;q13) of acute megakaryoblastic leukemia. *Nature genetics* **28**(3): 220-221

Marty, N.J., Holman, C.L., Abdullah, N. & Johnson, C.P. 2013. The C2 domains of otoferlin, dysferlin, and myoferlin alter the packing of lipid bilayers. *Biochemistry* **52**(33): 5585-5592

Mercher, T., Coniat, M.B., Monni, R., Mauchauffe, M., Nguyen Khac, F., Gressin, L., Mugneret, F., Leblanc, T., Dastugue, N., Berger, R. & Bernard, O.A. 2001. Involvement of a human gene related to the Drosophila spen gene in the recurrent t(1;22) translocation

of acute megakaryocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(10): 5776-5779

Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I. & Treisman, R. 2003. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**(3): 329-342

Monteiro, L., Ricardo, S., Delgado, M., Garcez, F., do Amaral, B. & Lopes, C. 2014. Phosphorylated EGFR at tyrosine 1173 correlates with poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oral diseases* **20**(2): 178-185

Moore, C.B., Guthrie, E.H., Huang, M.T. & Taxman, D.J. (2010) Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. In: RNA Therapeutics : Function, Design, and Delivery. Methods Mol Biol, Vol. 629, 2010/04/14, S: 141-158. 1064-3745

Mordret, G. 1993. MAP kinase kinase: a node connecting multiple pathways. *Biology of the cell* **79**(3): 193-207

Mühlich, S., Hampl, V., Khalid, S., Singer, S., Frank, N., Breuhahn, K., Gudermann, T. & Prywes, R. 2012. The transcriptional coactivators megakaryoblastic leukemia 1/2 mediate the effects of loss of the tumor suppressor deleted in liver cancer 1. *Oncogene* **31**(35): 3913-3923

Mühlich, S., Wang, R., Lee, S.M., Lewis, T.C., Dai, C. & Prywes, R. 2008. Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Molecular and cellular biology* **28**(20): 6302-6313

Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T. & Sato, J. 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer research* **42**(9): 3858-3863

Naldini, L. 1998. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Current opinion in biotechnology* **9**(5): 457-463

Ng, I.O., Liang, Z.D., Cao, L. & Lee, T.K. 2000. DLC-1 is deleted in primary hepatocellular carcinoma and exerts inhibitory effects on the proliferation of hepatoma cell lines with deleted DLC-1. *Cancer research* **60**(23): 6581-6584

Nüsse, M., Beisker, W., Hoffmann, C. & Tarnok, A. 1990. Flow cytometric analysis of G1- and G2/M-phase subpopulations in mammalian cell nuclei using side scatter and DNA content measurements. *Cytometry* **11**(7): 813-821

- Oda, K., Matsuoka, Y., Funahashi, A. & Kitano, H. 2005. A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology* **1**(1)
- Pawlak, G. & Helfman, D.M. 2001. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Current opinion in genetics & development* **11**(1): 41-47
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. & Cobb, M.H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* **22**(2): 153-183
- Pipes, G.C., Creemers, E.E. & Olson, E.N. 2006. The myocardin family of transcriptional coactivators: versatile regulators of cell growth, migration, and myogenesis. *Genes & development* **20**(12): 1545-1556
- Poojari, R., Kini, S., Srivastava, R. & Panda, D. 2015. A Chimeric Cetuximab-Functionalized Corona as a Potent Delivery System for Microtubule-Destabilizing Nanocomplexes to Hepatocellular Carcinoma Cells: A Focus on EGFR and Tubulin Intracellular Dynamics. *Molecular pharmaceutics* **12**(11): 3908-3923
- Razali, N.M. & Wah, Y.B. 2011. Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of statistical modeling and analytics* **2**(1): 21-33
- Riede, U.-N., Werner, M. & Schäfer, H.-E. (2004) Allgemeine und spezielle Pathologie, 5., komplett überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag 3-13-683305-8
- Sanders, F.K. & Burford, B.O. 1964. Ascites tumours from BHK.21 cells transformed in vitro by polyoma virus. *Nature* **201**: 786-789
- Schoeberl, B., Eichler-Jonsson, C., Gilles, E.D. & Müller, G. 2002. Computational modeling of the dynamics of the MAP kinase cascade activated by surface and internalized EGF receptors. *Nature biotechnology* **20**(4): 370-375
- Schratt, G., Weinhold, B., Lundberg, A.S., Schuck, S., Berger, J., Schwarz, H., Weinberg, R.A., Rüther, U. & Nordheim, A. 2001. Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* **21**(8): 2933-2943
- Schütt, C. & Bröker, B. (2011) Grundwissen Immunologie, 3. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag 978-3-8274-2646-8

- Seger, R. & Krebs, E.G. 1995. The MAPK signaling cascade. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **9**(9): 726-735
- Selvaraj, A. & Prywes, R. 2003. Megakaryoblastic leukemia-1/2, a transcriptional co-activator of serum response factor, is required for skeletal myogenic differentiation. *The Journal of biological chemistry* **278**(43): 41977-41987
- Selvaraj, A. & Prywes, R. 2004. Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent. *BMC molecular biology* **5**(1): 13
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. & Lowe, S.W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **88**(5): 593-602
- Sherwood, S.W., Rush, D., Ellsworth, J.L. & Schimke, R.T. 1988. Defining cellular senescence in IMR-90 cells: a flow cytometric analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(23): 9086-9090
- Starley, B.Q., Calcagno, C.J. & Harrison, S.A. 2010. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology (Baltimore, Md)* **51**(5): 1820-1832
- Stewart, S.A., Ben-Porath, I., Carey, V.J., O'Connor, B.F., Hahn, W.C. & Weinberg, R.A. 2003a. Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence. *Nature genetics* **33**(4): 492-496
- Stewart, S.A., Dykxhoorn, D.M., Palliser, D., Mizuno, H., Yu, E.Y., An, D.S., Sabatini, D.M., Chen, I.S., Hahn, W.C., Sharp, P.A., Weinberg, R.A. & Novina, C.D. 2003b. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA (New York, NY)* **9**(4): 493-501
- Svoboda, P., Stein, P. & Schultz, R.M. 2001. RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: effectiveness of hairpin dsRNA. *Biochemical and biophysical research communications* **287**(5): 1099-1104
- Tejeda-Maldonado, J., García-Juárez, I., Aguirre-Valadez, J., González-Aguirre, A., Vilatobá-Chapa, M., Armengol-Alonso, A., Escobar-Penagos, F., Torre, A., Sánchez-Ávila, J.F. & Carrillo-Pérez, D.L. 2015. Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma: An update. *World journal of hepatology* **7**(3): 362-376

- Thomas, P. & Smart, T.G. 2005. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **51**(3): 187-200
- Thomson, S., Mahadevan, L.C. & Clayton, A.L. 1999. MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Seminars in cell & developmental biology* **10**(2): 205-214
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**(9): 4350-4354
- Treisman, R. 1992. The serum response element. *Trends in biochemical sciences* **17**(10): 423-426
- Turtoi, A., Blomme, A., Bellahcène, A., Gilles, C., Hennequière, V., Peixoto, P., Bianchi, E., Noel, A., De Pauw, E., Lifrange, E., Delvenne, P. & Castronovo, V. 2013. Myoferlin is a key regulator of EGFR activity in breast cancer. *Cancer research* **73**(17): 5438-5448
- Visakorpi, T., Kallioniemi, A.H., Syvänen, A.C., Hyytinen, E.R., Karhu, R., Tammela, T., Isola, J.J. & Kallioniemi, O.P. 1995. Genetic changes in primary and recurrent prostate cancer by comparative genomic hybridization. *Cancer research* **55**(2): 342-347
- Volakis, L.I., Li, R., Ackerman, W.E.t., Mihai, C., Bechel, M., Summerfield, T.L., Ahn, C.S., Powell, H.M., Zielinski, R., Rosol, T.J., Ghadiali, S.N. & Kniss, D.A. 2014. Loss of myoferlin redirects breast cancer cell motility towards collective migration. *PloS one* **9**(2): e86110
- Waghray, A., Murali, A.R. & Menon, K.N. 2015. Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *World journal of hepatology* **7**(8): 1020-1029
- Wang, C., Wang, J., Liu, H. & Fu, Z. 2014. Tumor suppressor DLC-1 induces apoptosis and inhibits the growth and invasion of colon cancer cells through the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncology reports* **31**(5): 2270-2278
- Wang, W.S., Liu, X.H., Liu, L.X., Lou, W.H., Jin, D.Y., Yang, P.Y. & Wang, X.L. 2013. iTRAQ-based quantitative proteomics reveals myoferlin as a novel prognostic predictor in pancreatic adenocarcinoma. *Journal of proteomics* **91**: 453-465

- Wei, S., Wei, S. & Sedivy, J.M. 1999. Expression of catalytically active telomerase does not prevent premature senescence caused by overexpression of oncogenic Ha-Ras in normal human fibroblasts. *Cancer research* **59**(7): 1539-1543
- Wiesenauer, C.A., Yip-Schneider, M.T., Wang, Y. & Schmidt, C.M. 2004. Multiple anticancer effects of blocking MEK-ERK signaling in hepatocellular carcinoma. *Journal of the American College of Surgeons* **198**(3): 410-421
- Wong, C.M., Lee, J.M., Ching, Y.P., Jin, D.Y. & Ng, I.O. 2003. Genetic and epigenetic alterations of DLC-1 gene in hepatocellular carcinoma. *Cancer research* **63**(22): 7646-7651
- Wong, C.M., Yam, J.W., Ching, Y.P., Yau, T.O., Leung, T.H., Jin, D.Y. & Ng, I.O. 2005. Rho GTPase-activating protein deleted in liver cancer suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma. *Cancer research* **65**(19): 8861-8868
- Xue, W., Krasnitz, A., Lucito, R., Sordella, R., VanAelst, L., Cordon-Cardo, C., Singer, S., Kuehnel, F., Wigler, M., Powers, S., Zender, L. & Lowe, S.W. 2008. DLC1 is a chromosome 8p tumor suppressor whose loss promotes hepatocellular carcinoma. *Genes & development* **22**(11): 1439-1444
- Yang, X., Zhou, X., Tone, P., Durkin, M.E. & Popescu, N.C. 2016. Cooperative antiproliferative effect of coordinated ectopic expression of DLC1 tumor suppressor protein and silencing of MYC oncogene expression in liver cancer cells: Therapeutic implications. *Oncology letters* **12**(2): 1591-1596
- Yarden, Y. & Pines, G. 2012. The ERBB network: at last, cancer therapy meets systems biology. *Nature reviews Cancer* **12**(8): 553-563
- Yarden, Y. & Schlessinger, J. 1987. Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor. *Biochemistry* **26**(5): 1443-1451
- Yuan, B.Z., Jefferson, A.M., Baldwin, K.T., Thorgeirsson, S.S., Popescu, N.C. & Reynolds, S.H. 2004. DLC-1 operates as a tumor suppressor gene in human non-small cell lung carcinomas. *Oncogene* **23**(7): 1405-1411
- Yuan, B.Z., Miller, M.J., Keck, C.L., Zimonjic, D.B., Thorgeirsson, S.S. & Popescu, N.C. 1998. Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer research* **58**(10): 2196-2199

Yuan, B.Z., Zhou, X., Durkin, M.E., Zimonjic, D.B., Gumundsdottir, K., Eyfjord, J.E., Thorgeirsson, S.S. & Popescu, N.C. 2003. DLC-1 gene inhibits human breast cancer cell growth and in vivo tumorigenicity. *Oncogene* **22**(3): 445-450

Zhou, X., Thorgeirsson, S.S. & Popescu, N.C. 2004. Restoration of DLC-1 gene expression induces apoptosis and inhibits both cell growth and tumorigenicity in human hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* **23**(6): 1308-1313

Zhou, X., Zimonjic, D.B., Park, S.W., Yang, X.Y., Durkin, M.E. & Popescu, N.C. 2008. DLC1 suppresses distant dissemination of human hepatocellular carcinoma cells in nude mice through reduction of RhoA GTPase activity, actin cytoskeletal disruption and down-regulation of genes involved in metastasis. *International journal of oncology* **32**(6): 1285-1291

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A

APS	Ammoniumperoxodisulfat
AUC	Area under the curve

B

BAEC-Zellen	bovine aortale Endothelzellen
BCLC-System	Barcelona Clinic Liver Cancer Staging System
BSS	Balanced Salt Solution

C

CaCl ₂	Caliumchlorid
CaPO ₄	Calciumphosphat
Cdc42	Cell division control protein 42

D

dd	doppelt destilliert
DDR	DNA-Damage-Response
DLC1	Deleted in liver cancer 1
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	N-N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol

E

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epitheliale-Mesenchymale Transition

ERK1/2	Extracellular-signal-Related-Kinase 1/2
F	
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
G	
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H	
HBS	Hepes Buffered Saline
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperaziny)-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
Hsp90	heat shock protein 90
I	
IEG	Immediate Early Genes
IGF	insulin-like-growth-factor
IGFR	insulin-like-growth-factor-Rezeptor
K	
KCL	Kaliumchlorid
KD	Knockdown
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L	
LLC-Zellen	Lewis-Lungenkarzinom-Zellen

M

MAP	mitogen-activated protein
MKL1/2	Megakaryoblastic Leukemia 1/2
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger RNA
Myof	Myoferlin

N

Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom

P

PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
pEGFR	phosphorylierter EGF-Rezeptor
pEGFR ^{Y1173}	an Tyrosin 1173 phosphorylierter EGF-Rezeptor
pERK	phosphoryliertes ERK
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid

Q

QQ-Plot	Quantile-Quantile-Plot
---------	------------------------

R

Rb	Retinoblastom-Protein
RhoA	Ras homolog gene family, member A

S

SD	Standardabweichung
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfate
shRNA	short hairpin RNA

siRNA	small interfering RNA
SRE	Serum Response Element
SRF	Serum Response Factor

T

TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

V

VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus

X

x g	Fallbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Gudermann für die Möglichkeit, meine Promotionsarbeit unter seiner Leitung durchzuführen, und die Betreuung der Arbeit bedanken.

Bei Frau PD Dr. Susanne Mühlich möchte ich mich ganz herzlich für die praktische Betreuung der Arbeit im Labor und die Unterstützung beim Verfassen der Promotionsarbeit bedanken. Des Weiteren möchte ich für ihre großartige Unterstützung bei allen erdenklichen aufgetretenen Fragen bedanken.

Ich möchte mich außerdem bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Mühlich für die Hilfe und Tipps bei der Arbeit im Labor bedanken, insbesondere bei Frau Beer und bei Constanze Herrmanns.

Ein besonderes Dankeschön gilt meiner Familie, vor allem meinem Vater, für die Unterstützung während Studium und Promotion. Danken möchte ich außerdem meinen Freunden für die vielseitige Hilfe während der Zeit der Promotion. Ganz besonders möchte ich mich dabei bei Sophie bedanken, die mir jederzeit zur Seite stand. Ein besonderer Dank gilt meinem Freund Sebastian für die großartige Unterstützung und die Ermutigung während jeder Phase dieser Promotionsarbeit.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Eidesstattliche Versicherung

Frank, Natalie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**"Die Bedeutung von DLC1, MKL1/2 und Myoferlin für das Proliferationsverhalten
hepatozellulärer Karzinomzellen"**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, 20.11.2018

Ort, Datum

Natalie Frank

Unterschrift Doktorandin/Doktorand